

**Федеральный исследовательский центр
"Фундаментальные основы биотехнологии" Российской академии наук
Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН**

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)

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
доктор химических наук,
профессор В.И. Тишков

Москва – 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ.

Список сокращений	5
I. Введение	7
II. Обзор литературы	10
2.1. Пенициллинацилаза: история открытия.	10
2.2. Пенициллинацилазы из разных источников.	13
2.3. Каталитический механизм пенициллинацилазы.	16
2.4. Экспрессия гена пенициллинацилазы в <i>E.coli</i> : особенности процессинга и фолдинга.	17
2.4.1. Исследование механизма фолдинга пенициллинацилазы.	18
2.4.2. Роль спейсера в фолдинге пенициллинацилазы.	21
2.4.3. Роль иона кальция в фолдинге пенициллинацилазы.	22
2.5. Экспрессия и фолдинг рекомбинантных белков.	24
2.6. Рефолдинг белков из телец включения.	27
2.6.1. Рефолдинг: общие положения.	27
2.6.2. Рефолдинг пенициллинацилазы.	28
2.7. Пермутированные белки.	30
2.8. Одноцепочечные белки.	35
2.9. Стабильность пенициллинацилазы.	37
2.10. Культивирование штаммов-продуцентов пенициллинацилазы.	41
2.10.1. Системы экспрессии на основе бактерий.	44
2.10.2. Системы экспрессии на основе дрожжей.	45
2.10.3. Оптимизация факторов биосинтеза пенициллинацилазы.	46
2.11. Очистка пенициллинацилазы.	47
2.12. Применение пенициллинацилазы.	56
2.12.1. Полусинтетические β -лактамные антибиотики.	56
2.12.2. Разделение смеси энантиомеров и энантиоселективный синтез.	64
2.12.3. Пептидный синтез.	65
2.12.4. Направленная доставка лекарств.	67
2.13. Пенициллинацилаза G из бактерии <i>A.faecalis</i>	69

III. Материалы и методы	72
3.1. Материалы.	72
3.1.1. Реактивы.....	72
3.1.2. Бактериальные штаммы и плазмиды.....	73
3.2. Методы исследования.	74
3.2.1. Моделирование структуры одноцепочечной пенициллинацилазы.....	74
3.2.2. Получение генно-инженерной конструкции.	74
3.2.3. Подготовка компетентных клеток <i>E.coli</i>	77
3.2.4. Трансформация компетентных клеток <i>E.coli</i>	78
3.2.5. Культивирование рекомбинантного штамма <i>E.coli</i>	78
3.2.6. Выделение фермента из клеток <i>E.coli</i>	79
3.2.7. Очистка ферментов.....	80
3.2.8. Измерение активности.	81
3.2.9. Определение кинетических параметров.	81
3.2.10. Титрование активных центров.....	81
3.2.11. Изучение термостабильности.	82
3.2.12. Изучение термостабильности методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК).	82
3.2.13. Изучение рН-оптимума активности.	83
3.2.14. Электрофорез белков.	83
3.2.15. Рефолдинг.	84
IV. Результаты и их обсуждение	86
4.1. Клонирование гена, экспрессия и характеристика рекомбинантной пенициллинацилазы из <i>A.faecalis</i> дикого типа и ее мутантных форм со случайными мутациями, полученных при клонировании.....	86
4.1.1. Клонирование гена пенициллинацилазы из <i>A.faecalis</i>	86
4.1.2. Секвенирование плазмид и сравнительный анализ полученных последовательностей.....	87
4.1.3. Экспрессия мутантных форм рекомбинантной AfPIA в <i>E.coli</i>	91
4.1.4. Выделение и очистка фермента дикого типа и его мутантов.....	94

4.1.5. Изучение каталитических свойств фермента дикого типа и его мутантов.	94
4.1.6. Сравнительное изучение термостабильности мутантных AfПА.	96
4.1.7. Изучение термостабильности фермента дикого типа.	98
4.2. Одноцепочечная пенициллинацилаза из <i>A.faecalis</i> .	105
4.2.1. Компьютерное моделирование структуры вариантов одноцепочечной формы AfПА.	105
4.2.2. Получение генов двух вариантов одноцепочечной AfПА.	108
4.2.3. Переклонирование sc-AfПА1, sc-AfПА2 и wt-AfПА в вектор pET24a(+) и создание новой системы экспрессии на основе штамма <i>E.coli</i> BL21(DE3) CodonPlus/pLysS.	109
4.2.4. Экспрессия гена фермента дикого типа в системе экспрессии pET24a(+) / <i>E.coli</i> BL21(DE3) CodonPlus/pLysS.	109
4.2.5. Экспрессия гена sc-AfПА в системе экспрессии pET24a(+) / <i>E.coli</i> BL21(DE3) CodonPlus/pLysS.	111
4.2.6. Рефолдинг sc-AfПА из телец включения.	126
4.2.7. Разработка методики очистки sc-AfПА.	129
4.2.8. Характеристика одноцепочечных форм AfПА.	132
V. Выводы	142
VI. Список литературы	144

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ПА – пенициллинацилаза

EcПА – пенициллинацилаза из *Escherichia coli*

TthПА – пенициллинацилаза из *Thermus thermophilus*

PrПА – пенициллинацилаза из *Providencia rettgeri*

AfПА – пенициллинацилаза из *Alcaligenes faecalis*

sc-AfПА – одноцепочечная (пермутированная) пенициллинацилаза из *A.faecalis*

wt-AfПА – пенициллинацилаза из *Alcaligenes faecalis* дикого типа

Ntn – N-концевой нуклеофил (N-terminal nucleophile)

AHL – ацилгомосеринлактон, HSL – гомосеринлактон

PMSF – фенилметилсульфонилфторид

IPTG – изопротил- β -D-1-тиогалактопиранозид

NIPAB – *n*-нитро-*m*-карбоксиванилид фенилуксусной кислоты

NABA – *n*-нитро-*m*-аминобензойная кислота

PDB – Protein Data Bank

КД – круговой дихроизм

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

RBS-участок – рибосомосвязывающий участок (ribosomal binding site)

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ХГЧ – хорионический гонадотропин человека

Fv – вариабельный фрагмент антитела

ПААГ – полиакриламидный гель

ДСК – дифференциальная сканирующая калориметрия

ANS – 8-анилинонафталин-1-сульфоновая кислота

ТАК – теория активированного комплекса

FT-IR – ИК-спектроскопия с преобразованием Фурье (Fourier transform infrared spectroscopy)

7-АДЦК – 7-аминодезацетоксицефалоспоровая кислота

FRET – ферстеровский резонансный перенос энергии (Förster resonance energy transfer)

MALDI-TOF MS – матрично активированная лазерная десорбция/ионизация (Matrix-associated laser desorption/ionization, time-of-flight mass spectrometry)

ATPS – водная двухфазная система (aqueous two-phase system)

PVDF – поливинилиденфторид (polyvinylidene fluoride)

ИМАС – аффинная хроматография с иммобилизованными ионами металлов (immobilized metal affinity chromatography)

ИМАМс – аффинные мембраны (immobilized metal affinity membranes)

ИДА – иминодиуксусная кислота

НТА – нитрилотриуксусная кислота (nitrilotriacetic acid)

ТФФ-АЕМС – тангенциальная проточная фильтрация и анионообменная мембранная хроматография (tangential flow filtration and anion-exchange membrane chromatography)

НИС – хроматография гидрофобных взаимодействий (hydrophobic interaction chromatography)

НСИС – гидрофобная хроматография индукционного заряда (hydrophobic charge induction chromatography)

CLEAs – сшитые агрегаты фермента (cross-linked enzyme aggregates)

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

HPLC – high performance liquid chromatography

S-Pharm – фенилацетамидометил

NIR – ближний ИК-диапазон (near-infrared)

OmpF – белок F внешней мембраны (outer membrane protein F)

ПАВА – *para*-аминобензил

Tris – трис(гидроксиметил)аминометан

SDS – додецилсульфат натрия (sodium dodecyl sulfate)

ТЕМЕД – тетраметилэтилендиамин (tetramethylethylenediamine)

A.U. – единицы поглощения (absorbance units)

CV – объем колонки (column volume)

I. ВВЕДЕНИЕ

Пенициллинацилаза (ПА; КФ 3.5.1.11) была впервые открыта в 1960 г. и изучается более полувека. Основные области применения фермента – получение полусинтетических β -лактамных антибиотиков и оптически чистых соединений. Публикации по теме пенициллинацилазы посвящены изучению механизма катализируемой реакции и механизма процессинга, клонированию ферментов из разных бактерий, повышению уровня экспрессии рекомбинантной пенициллинацилазы и иммобилизации.

Ранее в нашей лаборатории был клонирован ген пенициллинацилазы из штамма *Alcaligenes faecalis* VKM В-1518 (DSM) (wt-AfПА) из Всероссийской коллекции микроорганизмов г. Пущино (GenBank: accession № FJ042491.1). Данный фермент содержит восемь уникальных аминокислотных замен по сравнению с другими известными ПА из различных штаммов бактерии *Alcaligenes faecalis*. Соответствующий фермент представляет собой объект исследования настоящей работы.

Ген ПА (*pac*) кодирует неактивный полипептид-предшественник, содержащий сигнальный пептид, α -субъединицу, спейсер и β -субъединицу. Созревание фермента до активного гетеродимера протекает через сложный многоэтапный процессинг, включающий опосредованную сигнальной последовательностью транспортировку полипептида-предшественника из цитоплазмы клетки *E.coli* в периплазму, отщепление сигнального пептида и последовательное удаление спейсера. Посттрансляционная модификация wt-AfПА имеет сложную регуляцию и представляет лимитирующую стадию созревания фермента. Ранее на примере ПА из *E.coli* было показано, что введение мутаций в ген фермента влияет на эффективность и скорость процессинга wt-AfПА, и для каждого мутанта требовалась оптимизация условий экспрессии, что является длительным и дорогостоящим процессом. Отсюда возникает проблема стандартизации условий экспрессии мутантных форм, решение которой позволило бы получать мутанты при одинаковых условиях культивирования с одинаковым выходом. В связи с этим актуален поиск новых конструкций, обеспечивающих

более простой путь получения ПА и исключая процессинг. В данной работе с применением метода пермутации была получена новая генно-инженерная конструкция, кодирующая одноцепочечную AfПА.

Метод пермутации является одним из известных подходов к изучению взаимосвязи структура – функция, деталей механизма функционирования ферментов, а также при создании биосенсоров и химерных белков. Пермутация определяется как реорганизация структуры белка за счет ковалентного соединения с помощью короткого олигопептида исходных N- и C-концов полипептидной цепи и создание новых N- и C-концов в другом положении за счет введения разрыва пептидной связи между двумя аминокислотными остатками, как правило, в гибких участках молекулы белка, например, в петлях. Конструирование пермутированных белков осуществляется на уровне гена.

Анализ трехмерной структуры AfПА показал, что N-конец α -субъединицы и C-конец β -субъединицы сближены в пространстве. Таким образом, в случае пенициллинацилазы достаточно просто соединить N- и C-концы линкером, при этом получается одна полипептидная цепь с каталитическим остатком серина β -субъединицы на N-конце полипептида. В структуре гена нового одноцепочечного белка отсутствуют участки, кодирующие сигнальный пептид и спейсер, а участки гена для α - и β -субъединиц следуют в обратном порядке, если сравнивать с AfПА дикого типа. То есть происходит изменение порядка расположения двух субъединиц, "перестановка", или пермутация.

Существует только одна публикация, описывающая получение одноцепочечной пермутированной ПА из *E.coli*, где применяли метод неупорядоченного мутагенеза для линкера, соединяющего субъединицы. Похожих работ для ПА из *A.faecalis* не опубликовано. В данной работе впервые получен гомогенный препарат активной одноцепочечной AfПА в количестве, достаточном для детальной характеристики фермента.

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 (β Pro551) 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.

II. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

2.1. Пенициллинацилаза: история открытия

Первая статья о пенициллинацилазе была опубликована в 1950 году японскими учеными [1]. О ней упоминается 10 лет спустя в журнале *Nature*, где сообщается, что пенициллинацилаза была обнаружена в мицелии грибов *Penicillium chrysogenum* и *Aspergillus oryzae*. Впервые была открыта именно пенициллинацилаза G, то есть гидролизующая преимущественно пенициллин G, или бензилпенициллин. В целом, мнение научного сообщества о статье [1] было очень противоречивое. Некоторые ученые очень критично и с недоверием относились к результатам этой работы, так как, по их мнению, эксперименты невоспроизводимы [2] и не имеют достаточной доказательной базы [3], другие же наоборот оправдывали статью, предлагая объективное объяснение результатам [4].

Согласно статье [4], на тот момент пенициллинацилаза была обнаружена в бактериях рода *Schizomycetes*, *Nocardia*, *Proteus*, а также в стрептомицетах и грибах. Фермент ПА из этих представителей царств живой природы характеризуется другой субстратной специфичностью и гидролизует преимущественно феноксиметилпенициллин. На основании анализа пенициллинацилазной активности как в клетках, так и в супернатанте над клеточным осадком, в статье [4] было показано, что локализация фермента внутриклеточная. Авторы статьи [4] изучили зависимость активности ПА от pH раствора, при этом максимальная активность наблюдалась при pH 8.0. В работе [4] также было установлено, что наличие заместителей в бензольном кольце пенициллина G приводит к снижению активности фермента по отношению к бензилпенициллину. Сравнение ферментов из *Nocardia* и *Proteus* показало, что увеличение объема боковой цепи, например, при переходе феноксиметильному заместителю в β -лактамном ядре пенициллина G, приводит к относительно более заметному снижению активности ПА из *Nocardia*, что свидетельствует о наличии пространственных препятствий для проникновения гидрофобных субстратов в активный центр фермента.

О метаболической функции ПА не было известно ничего [5]. Первые предположения о роли фермента в природе [6] были связаны с резистентностью некоторых патогенных микроорганизмов (*Staphylococcus aureus*, *Sarcina lutea*) к пенициллину. Тем не менее резистентность связывали главным образом с синтезом β -лактамазы, или пенициллиназы, в то время как в случае пенициллинацилазы подобная связь была менее очевидной [7]. В работе [7] исследованы ферменты β лактамаза и ПА из патогенных и симбиотических штаммов бактерий, выделенных из человека. Интересно, что у пациентов, которые получали пенициллин, наблюдался повышенный уровень β -лактамазы по сравнению с контрольной группой, отличия в синтезе ПА не наблюдалось. В обсуждении результатов [7] особое внимание акцентируется на факторах, отвечающих за резистентность микроорганизмов к пенициллину. Авторы особо подчеркивают тот факт, что такие штаммы, как *Escherichia coli* и другие палочки, населяющие кишечник человека и представляющие собой нормальную микрофлору, характеризуются более высоким уровнем экспрессии пенициллинацилазы по сравнению с β -лактамазой. Патогенные штаммы бактерий, например, из группы *Klebsiella aerogenes* синтезируют больше β -лактамазы, чем ПА. Анализ бактериальных штаммов, выделенных из человека, показал отсутствие пенициллинацилазной активности в случае грамположительных бактерий. В статье обсуждается предыдущий опыт по этому вопросу и особо отмечается факт, что исследователи либо не пытаются идентифицировать пенициллинацилазу, либо используют неадекватный метод для ее определения. Все это указывает на недостаточность базы экспериментальных методов исследования, что приводит к неверным выводам, и как следствие, к разногласиям в научных работах, принадлежащим разным группам ученых.

В работе тех же авторов [8] показано, что метод инфракрасной абсорбционной спектроскопии позволяет отдельно определить β -лактамазу и пенициллинацилазу. Авторы обнаружили, что отдельные пенициллины, а именно метициллин и клоксациллин, быстрее расщепляются β -лактамазой, если сначала провести реакцию с пенициллинацилазой.

Позже были опубликованы две статьи [3, 9], касающиеся уже не бактериальной пенициллинацилазы, а фермента из грибов *Penicillium chrysogenum*, где ПА была впервые обнаружена в 1950 г. Штамм *Penicillium chrysogenum* – это пенициллин-продуцирующие грибы, которые используются в биотехнологии для получения пенициллина. Обе статьи указывают на образование 6-аминопенициллановой кислоты, сопутствующее биосинтезу пенициллина грибами *Penicillium chrysogenum*.

Согласно статье [3], разные стрептомицеты и грибы продуцируют ферменты (ПА) с разной субстратной специфичностью, гидролизующие разные пенициллины (G, V или K).

Способны ли продуцирующие пенициллин грибы синтезировать также 6-АПК и ПА, обсуждается в статье [9]. Методом бумажной хроматографии было доказано, что штаммы *Trichophyton mentagrophytes*, *Aspergillus ochraceous*, *Penicillium sp.* и *Epidermophyton floccosum* синтезируют смесь пенициллинов G, K, F, V, но преимущественно пенициллин G. Перечисленные штаммы за исключением последнего помимо основного антибиотика также содержали 6-АПК. Пенициллинацилазную активность детектировали по образованию продукта реакции – пенициллина G или V – после добавления к грибному мицелию соответствующего ацильного донора – фенилуксусной кислоты или феноксиуксусной кислоты.

Вопрос о метаболической роли пенициллинацилазы продолжал волновать исследователей, и было высказано предположение, что пенициллинацилаза не участвует в механизме, отвечающем за резистентность бактерий к пенициллину [10].

В статье [11] описана пенициллинацилаза, выделенная из грибов *Fusarium avenacium* и *Penicillium chrysogenum*, гидролизующая преимущественно пенициллин V. Рассуждая о происхождении 6-АПК в мицелии гриба *Penicillium chrysogenum*, авторы статьи [11] приходят к выводу, что 6-АПК образуется в результате деацилирования алифатических пенициллинов (F, K), а не из промежуточных продуктов биосинтеза пенициллина, таких как изопенициллин N.

2.2. Пенициллинацилазы из разных источников

На настоящий момент известны ПА из прокариот – бактерий, а также из эукариот – из дрожжей и филаментных грибов.

Известны бактериальные пенициллинацилазы из *Achromobacter xylosoxidans* [12], *Bacillus megaterium* [13-15], *Bacillusadius* [16], *Kluyvera cryocrescens* (ранее *K.citrophila*) [17, 18], *Arthrobacter viscosus* [19-22], *Providencia rettgeri* (ранее *Proteus rettgeri*) [23-28]. Ферменты, выделенные из вышеперечисленных микроорганизмов, отличаются по структуре, свойствам и локализации.

Природная ПА катализирует гидролиз амидной связи в пенициллине. ПА относится к семейству Ntn-гидролаз, то есть гидролаз с каталитическим нуклеофильным аминокислотным остатком на N-конце полипептидной цепи. Пенициллинацилазы по типу основного субстрата делятся на два класса: ПА G (гетеродимер с каталитическим остатком β Ser1) и ПА V (гомотетрамер с каталитическим остатком Cys1 [34]; гетеродимер с β Ser1 [35]).

Методом дифракции рентгеновского излучения была получена трехмерная структура для ПА-G из бактерий *E.coli*: 24 структуры, в том числе для мутантных форм, фермент-субстратных комплексов, нативной ПА (PDB 1PNK, 1PNM, 1PNL) и для белка-предшественника ПА (PDB 1E3A; 1,8 Å; 2000 г.; [36]); *Providencia rettgeri* (PDB 1CP9; 2,50 Å; 1999 г.; [37]), *Kluyvera cryocrescens* (PDB 4PEM; 2,50 Å; 2015 г.; работа не опубликована), *Alcaligenes faecalis* (PDB 3K3W; 3,31 Å; 2009 г.; [38]; PDB 3ML0; 3,5 Å; 2010 г.; [38]) и *Bacillus megaterium* (2,2 Å; 2011 г.; [39]), а также для ПА-V из бактерий *Bacillus sphaericus* (PDB 3PVA; 2,80 Å; 1999 г.; [40]), *Bacillus subtilis* (PDB 2OQC; 2,5 Å; 2008 г.; работа не опубликована), *Pectobacterium atrosepticum* (PDB 4WL2; 2,5 Å; 2015 г.; работа не опубликована).

В таблицах 2.1 и 2.2 сведены каталитические свойства ферментов из различных источников и особенности нуклеотидной последовательности гена и доменной организации полипептида-предшественника. За основу таблицы 2.2 была взята таблица из статьи [30] с некоторыми изменениями.

Таблица 2.1.

Свойства ПА-G из различных источников.

Источник ПА-G	pH оптимум	T оптимум, °C	K_m , мкМ (NIPAB)	k_{cat} , с ⁻¹ (NIPAB)	K_m , мкМ (пенициллин G)	k_{cat} , с ⁻¹ (пенициллин G)	Ссылка
<i>A.faecalis</i> CICC AS1.767	8	60	–	–	–	–	[29]
<i>A.faecalis</i> ATCC 19018	–	–	5,1±0,2	50±0,7 с ⁻¹ ; 35±0,4 Ед.·мг ⁻¹	2±0,2	63±3 с ⁻¹ ; 44±2 Ед.·мг ⁻¹	[30]
<i>A.faecalis</i> NCTC 415	–	–	12	82	8	80	[31]
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	8,5	60	27,0±1,0	68,8±3,8	8.9±0,4	72,7±3,0	[12]
<i>Arthrobacter viscosus</i>	–	–	–	–	420	–	[19]
<i>Bacillus megaterium</i>	8-9	45	–	–	450	–	[13]
<i>Bacillus badius</i>	6-8,5	50	41	33	39	40	[16]
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11105	8	60	–	–	–	–	[32]
<i>Escherichia coli</i>	–	–	20	20	10	50	[31]
<i>Kluyvera cryocrescens</i>	8,5	55	17,6	23,8 Ед.·мг ⁻¹	16	63	[18]
<i>Providencia rettgeri</i>	7,5	55	19,7±1,3	35,5±0,1 Ед.·мг ⁻¹	0,23	23,3 Ед.·мг ⁻¹	[33]

Биологическая функция ПА долгое время не изучалась, и все соображения о физиологической роли фермента ограничивались гипотезами. В работе [41] было показано, что ПА из *Kluyvera cryocrescens* DMSZ 2660 (ATCC 21285) способна действовать как ацилгомосеринлактонацилаза (АНЛ-ацилаза), так же как и другой представитель суперсемейства Ntn-гидролаз, АНЛ-ацилаза PvdQ из *Pseudomonas aeruginosa*. Деамидирование АНЛ-лактонов ферментом КсПА было подтверждено биологическими (штамм-биосенсор *Chromobacterium violaceum* tn5 мутант CV026) и химическими методами анализа, а также моделированием *in silico*. Оптимальная температура для АНЛ-ацилазной активности КсПА – 50°C, оптимальная величина pH – pH 8,0. Предпочитаемые субстраты КсПА помимо пенициллина G, С6-HSL и 3-оксо-С6-HSL. Ацилгомосеринлактоны представляют собой сигнальные молекулы, за счет которых обеспечивается взаимодействие бактерий и их вирулентность (кворум), в том числе формирование биопленок патогенными микроорганизмами. Разрушение АНЛ может привести к тушению кворума и в конечном результате к гибели бактерий. Тушение кворума может быть использовано в разработке новых антимикробных стратегий против патогенов [42].

Таблица 2.2.

Сравнительная характеристика некоторых свойств ПА-G из различных источников.

Фермент ПА-G	Открытая рамка считывания, нуклеотидов	Accession no. in GenBank database	GC-состав, %	Количество аминокислот, (СП- α -С- β)*	Ссылка
<i>Achromobacter xylooxidans</i>	2586/2532	AF490005.1	69	843 (21-247-18-557)	[12]
<i>Alcaligenes faecalis</i>	2451	U93881	57	816 (26-202-36-551)	[12, 30]
<i>Arthrobacter viscosus</i>	2406/2840	L04471	37	802 (26-208-31-537)	[12, 21]
<i>Bacillus badius</i>	2415	DQ115799	40	805 (24-212-31-538)	[16]
<i>Bacillus megaterium</i>	2908	U07682	36	802 (26-208-31-537)	[12]
<i>Escherichia coli</i>	2538	X04114	48	846 (26-209-54-557)	[12, 43, 44]
<i>Kluyvera cryocrescens</i>	2532	M15418	56	844 (26-209-54-555)	[21, 45]
<i>Providencia rettgeri</i>	2514	M86533	40	837 (23-205-56-553)	[21, 28, 30]

*СП – сигнальная последовательность, α – α -субъединица, С – спейсер, β – β -субъединица

2.3. Каталитический механизм пенициллинацилазы

Для определения роли отдельных аминокислот в структуре и катализе фермента проводится кинетическое и кристаллографическое изучение мутантных форм ключевых аминокислотных остатков, полученных методом направленного мутагенеза. Каталитический механизм ПА из *E.coli* включает последовательные этапы ацилирования и деацилирования фермента. Нуклеофильная атака атомом кислорода боковой цепи β Ser1 карбонильного углерода амидной (или сложноэфирной) связи активируется переносом протона на собственную α -аминогруппу. Таким образом, аминогруппа N-концевого аминокислотного остатка серина выступает в роли акцептора протона и активирует нуклеофильный гидроксил в остатке β Ser1. Формируется цвиттер-ионный тетраэдрический интермедиат. Отрицательный заряд оксианиона стабилизирован водородной связью с остатками оксианионной дырки. Протонированная α -аминогруппа остатка β Ser1 также участвует в слабых гидрофобных взаимодействиях. Разрушение тетраэдрического интермедиата включает протонирование нуклеофильной части и восстановление карбонильной функции субстрата. Формируется ацилфермент, и выделяется первый продукт реакции (первичный амин или спирт). Карбонильный углерод атакуется молекулой воды с образованием второго тетраэдрического интермедиата. Нуклеофильность молекулы воды усилена α -аминогруппой β Ser1. В результате выделяется карбокси-кислота, и каталитический центр фермента освобождается [46]. Тетраэдрический интермедиат, в частности, его отрицательно заряженный карбонильный кислород, стабилизирован водородными связями с амидами остатков главной цепи β Gln23, β Ala69 и боковой цепью β Asn241, которые образуют оксианионную дырку. Остаток β Asn241 балансирует отрицательный заряд на тетраэдрическом интермедиате [47]. Остатки α Arg145 и α Phe146 претерпевают значительные конформационные изменения при связывании субстрата, отдаляясь от активного центра. Роль остатков α Arg145 и β Arg263 изучали методом направленного мутагенеза [48].

Возникает вопрос, применим ли каталитический механизм ПА из *E.coli* для ферментов из других источников, в частности, ПА из *Alcaligenes faecalis*. На

основании проведенного исследования в статье [49], можно утверждать, что каталитический механизм ПА из *E.coli* и *A.faecalis* аналогичен за счет похожей структуры активного центра обоих ферментов [49].

В работе [50] изучена роль положительно заряженных остатков β R263 и α R145 в связывании субстрата с помощью теоретических (моделирование, молекулярная динамика) и экспериментальных методов. Остаток β R263 вносит электростатический вклад в продуктивное связывание субстрата. Остаток α R145 играет важную роль во взаимодействиях фермент-субстратного комплекса. Вышеупомянутые остатки β R263 и α R145 отвечают за специфичность ПА к отрицательно заряженным субстратам. Связывание субстрата ПА характеризуется тремя режимами: продуктивный, непродуктивный и предпродуктивный.

2.4. Экспрессия гена пенициллинацилазы в *E.coli*: особенности процессинга и фолдинга

В работе [51] было показано, что ПА из *E.coli* ATCC 11105 состоит из двух различных субъединиц. Также было обнаружено, что в клетках штамма-продуцента *E.coli* с плазмидой ПА содержится полипептид, который, по мнению авторов, представлял собой предшественник, связанный с мембраной клетки *E.coli* [52]. Позже в работе [53] была определена нуклеотидная последовательность гена, кодирующего ПА из бактерий *E.coli* ATCC 11105 и установлено соответствие четырех структурных доменов открытой рамки считывания гена ПА. Впервые в работе [53] были установлены следующие закономерности, характерные для посттрансляционного процессинга ПА. Две субъединицы (α и β) представляют собой продукты процессинга полипептида-предшественника, спейсер отщепляется в результате процессинга. При отсутствии сигнального пептида предшественник накапливается в цитоплазме, не подвергается протеолитическому процессингу в цитоплазме и не проявляет ферментативную активность. Таким образом, процессинг требует транспортировки предшественника через цитоплазматическую мембрану [53].

В научном исследовании [54] для изучения закономерностей посттрансляционного процессинга ПА (ЕсПА из *E.coli* ATCC 11105) применяли

метод направленного мутагенеза для введения дополнительных аминокислот, а также делеций в различных доменах полипептида-предшественника. Было установлено, что для корректного процессинга ПА важна не столько первичная структура полипептида-предшественника, сколько его правильная конформация. В статье [54] подчеркивается, что протеолитический процессинг характерен для вирусных белков, а также эукариотических гормонов, но не характерен для бактерий.

2.4.1. Исследование механизма фолдинга пенициллинацилазы

Для исследования закономерностей фолдинга ПА в работе [55] изучали процесс денатурации ПА с помощью метода флуоресцентной спектроскопии и спектроскопии кругового дихроизма в дальней УФ-области. Было установлено, что гетеродимерная ЕсПА денатурирует в узком диапазоне концентраций мочевины (в среднем, при 4,5 М мочевины). Из графика зависимости константы скорости денатурации от концентрации мочевины был посчитан градиент (6,6), величина которого характерна для денатурации белков, имеющих кооперативную организацию. Таким образом, процесс денатурации ПА кооперативный. Кинетика денатурации зависит от концентрации мочевины. Показано, что α -пептид денатурирует термодинамически обратимо, а β -пептид представляет собой главный лимитирующий фактор, препятствующий рефолдингу и сборке активного фермента из двух отдельных субъединиц [55].

Спектр кругового дихроизма в дальней УФ-области, полученный для гетеродимерной ПА из *E.coli*, свидетельствует о высокой упорядоченности вторичной структуры белка (24% α -спиралей и 57% β -листов). ПА представляет собой симметричный глобулярный белок сферической формы. Взаимодействия между α - и β -пептидами, образующими четвертичную структуру, нековалентные и преимущественно гидрофобные. Разделение α - и β -пептидов сопровождается потерей ферментативной активности. Гель-электрофорез с градиентом мочевины показал, что β -пептид агрегирует в широком диапазоне концентрации мочевины, а α -пептид способен обратимо сворачиваться в компактную структуру. α -Пептид после рефолдинга имеет асимметричную структуру с большим числом α -спиралей

по сравнению с нативной ПА. На основании полученных данных был сделан вывод, что α -пептид составляет главный домен при фолдинге полипептида-предшественника [55]. Отсутствие обратимого равновесия между процессами фолдинга и денатурации, а также наличие кинетической кооперативности денатурации, – две характерные черты белков, которые активируются протеолитически [55]. Эти свойства предполагают, что рефолдинг подобных белков невозможен либо сложно осуществим [56].

Знание механизма фолдинга белка *in vivo* позволяет судить о фундаментальных закономерностях, управляющих процессом фолдинга, и необходимо для теоретического предсказания пространственной структуры белков с помощью математических методов.

В статье [56] было особо подчеркнуто, что механизм фолдинга полипептида-предшественника ПА был неизвестен на тот момент. Там также упоминается, что была предпринята успешная попытка отдельной экспрессии каждой из двух субъединиц (α и β) на высоком уровне с накоплением в виде телец включения (работа не опубликована). Для выяснения закономерностей фолдинга авторы работы [56] исследовали зависимость фолдинга ЕсПА (из *E.coli* ATCC 11105) от таких факторов, как рН, ионная сила и температура. По результатам работы [56] было сделано два вывода. Первый вывод имеет фундаментальное значение, и касается роли спейсера, входящего в состав полипептида-предшественника, и заключается в том, что спейсер повышает вероятность продуктивных столкновений α - и β -пептидов. Второй вывод, имеющий практическое значение для биотехнологии, следующий – повышение температуры ухудшает фолдинг α -пептида, что открывает возможность температурной регуляции биосинтеза ПА *in vivo*, то есть, как правило, в штамме-продуценте *E.coli*.

Статья [57] посвящена отдельной экспрессии α - и β -субъединиц ЕсПА (*E.coli* ATCC 11105) в цитоплазме штамма-продуцента *E.coli*, то есть с двух отдельных плазмид, но в одной клетке. Было показано, что обе субъединицы успешно экспрессируются в цитоплазме *E.coli* и образуют активный гетеродимер с высоким итоговым уровнем экспрессии, который сравним с диким типом.

Отдельный эксперимент показал, что наличие спейсера, ковалентно связанного с С-концом α -субъединицы, приводит к понижению активности гетеродимерной ПА. Таким образом, спейсер не участвует в ферментативной активности ПА, а скорее предназначен для эффективного фолдинга полипептида-предшественника *in vivo*. В статье [57] подчеркивалось, что на тот момент было неизвестно, представляет ли собой процессинг автокаталитическую активность ацилазы или требует дополнительных протеаз. По результатам работы [57] следует вывод, что фолдинг и ассоциация двух субъединиц ЕсПА (*E.coli* ATCC 11105) не обязательно требует транспорта через цитоплазматическую мембрану и не обязательно должен протекать в периплазме, что не согласуется с результатами работы [53]. С другой стороны, факт, что формирование активного гетеродимера успешно протекает в цитоплазме бактерии *E.coli* после отдельной экспрессии двух субъединиц, ставит под вопрос вывод, что фолдинг обязательно начинается с α -субъединицы [55].

Возможность протекания процессинга в цитоплазме подтверждает статья [58], описывающая экспрессию гена ПА без сигнального пептида. Таким образом, в условиях эксперимента биосинтез, созревание и фолдинг локализованы в цитоплазме *E.coli*. Полученные результаты свидетельствуют, что определенный процент полипептида без сигнальной последовательности, но содержащей спейсер, способен приобретать активную трехмерную структуру гетеродимерной ПА с выщеплением спейсера в цитоплазме бактерии *E.coli*, а не в периплазме, как в случае ПА дикого типа.

В работе [44] была изучена способность α - и β -пептидов к рефолдингу. В рамках этого эксперимента была проведена экспрессия α -субъединицы и отдельно β -субъединицы. Было обнаружено, что экспрессия β -субъединицы приводила к накоплению β -пептида в нерастворимой форме. Более того, β -субъединица после денатурации была неспособна приобретать упорядоченную структуру. Полученный результат свидетельствует, что β -субъединица не способна существовать самостоятельно, а только в ассоциации с α -субъединицей.

Основные выводы, вытекающие из работ по процессингу, следующие: процессинг и фолдинг могут протекать как в цитоплазме, так в периплазме *E.coli*; фолдинг может иметь несколько разных путей.

Часто встречаемая проблема телец включения имеет место и при биосинтезе ПА. В статье [59] клетки *E.coli* исследовали на наличие телец включения методом трансмиссионной электронной микроскопии. Было показано, что при индукции IPTG низкой концентрации (до 0,1 мМ) наблюдаются только периплазматические тельца включения. При высоких концентрациях IPTG (0,2–0,5 мМ) тельца включения локализованы как в цитоплазме, так и в периплазме. Методом электрофореза и Вестерн-блота доказано, что в цитоплазме тельца включения содержат сигнальный пептид, а в периплазме не содержат. Таким образом, сигнальный пептид действительно отщепляется при пересечении цитоплазматической мембраны.

Опубликовано несколько работ, в которых исследовали роль кальция и спейсера в фолдинге и катализе пенициллинацилазы [44, 61].

2.4.2. Роль спейсера в фолдинге пенициллинацилазы

Роль спейсера в случае пенициллинацилазы аналогичная и заключается в содействии фолдингу полипептида-предшественника [44]. Если сравнивать бактериальные липазу и пенициллинацилазу, то спейсер (у ПА) или белок-активатор (в случае липазы) – это специфические белки, отвечающие за правильный фолдинг конкретной полипептидной цепи. Только в случае липазы белок-активатор закодирован отдельным геном, а в случае пенициллинацилазы спейсер закодирован внутри гена фермента. Причина такого отличия в регуляции экспрессии, вероятно, заключается в разной биологической функции фермента. Правильный фолдинг – завершающий момент в формировании правильной трехмерной структуры, позволяющей ферменту проявлять биологическую активность. Регуляция двух отдельных генов, один из которых кодирует фермент, а другой – белок-активатор, позволяет более точно контролировать экспрессию гена липазы, но в целом усложняет процесс регуляции.

В качестве краткого обобщения предыдущих работ по исследованию спейсеров, в статье [44] упоминается, что успешное выполнение их биологической роли состоит в сохранении вторичной структуры при возможной вариации аминокислотной последовательности.

Изучение термодинамики денатурации гетеродимерной ПА и полипептида-предшественника без сигнальной последовательности методами флуориметрии и спектроскопии кругового дихроизма в дальней УФ-области показало, что это кооперативный процесс, проходящий через два переходных состояния [44]. Это свидетельствует о наличии нескольких доменов, связанных слабыми взаимодействиями. Методом КД-спектроскопии было доказано, что отдельная α -субъединица после рефолдинга содержит больше α -спиралей по сравнению с гетеродимерной ПА [44], что подтверждает полученные ранее результаты [55].

Процессинг *in vitro* исследовали в работе [44] при начальных условиях, подразумевающих полную денатурацию полипептида-предшественника без сигнальной последовательности. Это соответствует Sec-системе транспортировки и локализации процесса в периплазме, то есть условия эксперимента наиболее приближены к условиям процессинга *in vivo*. Исследование фолдинга ПА [44] показало, что в отсутствие спейсера рефолдинг фермента протекает до стадии расплавленной глобулы, и нативная конформация фермента достигается при добавлении спейсера *in vitro*. КД-спектр показал, что вторичная структура спейсера соответствует α -спирали, что составляет необходимое условие для выполнения функции [44].

2.4.3. Роль иона кальция в фолдинге пенициллинацилазы

Методом атомной абсорбционной спектроскопии доказано, что расплавленная глобула содержит 80% ионов кальция [44]. Это означает, что связывание кальция происходит в процессе сворачивания полипептида-предшественника. Было показано, что в денатурированной форме ПА легко теряет ион кальция при инкубации с ЭДТА, в то время как гетеродимерная ПА характеризуется более прочной связью с кальцием. Вероятно, причина такого отличия состоит в пространственном расположении иона кальция относительно

полипептидной цепи. В зрелой ПА ряд аминокислотных остатков, координирующих ион кальция, создают препятствие для молекул ЭДТА. В денатурированной форме ПА структура неупорядочена и по большей части представляет собой статистический клубок, что делает потерю кальция более вероятным событием. Для изучения роли кальция в формировании активной ПА в работе [44] сначала денатурировали фермент в высокой концентрации мочевины, удаляли кальций и затем делали рефолдинг *in vitro* при разном содержании кальция. Контроль процессинга осуществляли с помощью электрофореза и флуоресценции связанной 8-анилинонафталин-1-сульфоновой кислоты. Наличие кальция в среде для рефолдинга способствует процессингу, что подтверждено контрольным экспериментом. В отсутствие кальция полипептид-предшественник сворачивается в некую упорядоченную структуру, но спейсер при этом не отщепляется. Отсюда следует вывод, что ион кальция не принимает участия в сворачивании полипептидной цепи, но отвечает за отщепление спейсера, а также смещает равновесие в сторону формирования нативной структуры.

В другой работе [61] также выясняли роль кальция для ПА и пришли к выводу, что ион кальция нужен для транспортировки белка-предшественника через цитоплазматическую мембрану. Если сравнивать Tat- и Sec-системы транспортировки, то Tat-системой транспортируется уже свернутый белок со связанным ионом кальция, в случае Sec-системы связывание кальция, согласно работе [44], невозможно, поскольку полипептидная цепь пространственно не организована. Таким образом, Tat-система требует присутствие ионов кальция для всех белков, Sec-система не требует.

Бактериальные пенициллинацилаза (3.5.1.11) и липаза (3.1.1.3), относящиеся к классу гидролаз, очень похожи в плане структуры гена и особенностей процессинга. Известно, что третичная структура липазы также содержит кальций-связывающий домен и дисульфидную связь, как и AfПА дикого типа. В работе [60] было установлено, что *in vitro* экспрессия липазы из *Burkholderia cepacia* зависит от активирующего гена, который кодирует белок-активатор и расположен после структурного гена. Полученные результаты показали, что дисульфидная связь

играет роль в фолдинге липазы, но не влияет на стабильность фермента. Согласно статье [60], процесс трансляции липазы в бесклеточной системе экспрессии занимает 20 мин, и добавление активатора после трансляции не приводит к сворачиванию полипептида в правильную структуру. Таким образом, трансляция и сворачивание полипептидной цепи протекают одновременно. В данном случае отсутствие активатора в процессе трансляции приводило к неправильному фолдингу липазы, который нельзя было исправить посредством добавления активатора после трансляции [60].

2.5. Экспрессия и фолдинг рекомбинантных белков

Для пенициллинацилазы все еще актуальна задача получения для конкретного промышленного процесса новых биокатализаторов с минимальной стоимостью. Один из факторов, позволяющих сделать процесс получения биокатализатора экономически выгодным, – увеличение уровня экспрессии фермента. Рассматривая повышение продуктивности биосинтеза пенициллинацилазы в *E.coli*, необходимо учитывать фундаментальные причинно-следственные взаимосвязи на молекулярном уровне, включая биохимические реакции внутри *E.coli*. Факторы, влияющие на эффективность процесса получения рекомбинантных белков в *E.coli*, подробно описаны в обзоре [62], где проводится некоторое разграничение этих факторов в зависимости от конкретного этапа биосинтеза белка посредством аппарата транскрипции/трансляции, фолдинга и системы транспортировки белков через цитоплазматическую мембрану. Таким образом, процесс экспрессии рекомбинантных белков в *E.coli* зависит от копияности и стабильности плазмидной ДНК на стадии репликации, от силы промотора на стадии транскрипции, а также от периода полураспада мРНК и состава RBS-участка (рибосомосвязывающего участка, RBS) мРНК на стадии трансляции [62]. Судьба полипептидной цепи после трансляции определяется, с одной стороны, активностью внутриклеточных протеаз, приводящей к деградации рекомбинантного белка, а с другой стороны, – эффективностью шаперонов, отвечающих за правильный фолдинг полипептидной цепи. Часто сталкиваются с такой проблемой, как накопление рекомбинантного белка в виде нерастворимых

телец включения. Причина этого явления пока не установлена, и качественная его оценка также неоднозначная.

Исследования, проведенные в работе [63], несколько разъясняют взаимосвязь физиологии клетки *E.coli*, экспрессии рекомбинантного белка и связанных с этим процессов протеолиза и формирования нерастворимых телец включения. На примере белка Zb-MalE было показано, что периплазматическая локализация белка обеспечивает меньший процент протеолитической деградации, если сравнивать с экспрессией в цитоплазме без сигнального пептида. Среди других факторов, позволяющих уменьшить процессы деградации и агрегации, были выделены скорость транскрипции и скорость трансляции. Небольшая величина обеих скоростей обеспечивает адекватное соотношение собственных процессов жизнедеятельности клетки и экспрессии рекомбинантного белка [63].

Как следует из результатов работы [64], экспрессия пенициллинацилазы дикого типа под контролем *araB*-промотора сопровождается значительным лизисом клеток *E.coli* HB101 и JM109, на что указывало наличие активности в среде, – до 80%. Одновременная экспрессия генов *pac* и *degP* повышает уровень экспрессии пенициллинацилазы и в то же время подавляет лизис клеток и образование телец включения. В другой статье [65] делается вывод, что арабиноза как индуктор превосходит IPTG для промоторов *trc* и *T7*, потому что дает такие же положительные эффекты, в том числе позволяет уменьшить лизис клеток до 15%. По сравнению с IPTG количество телец включения меньше в случае арабинозы и возрастает с повышением концентрации индуктора. По результатам работы [65] можно сделать два вывода. Во-первых, одновременное присутствие двух промоторов, индуцируемых арабинозой, *trc* и *araB*, отражается на работе каждого промотора. Во-вторых, наличие двух индукторов, IPTG и арабинозы, приводит к синергетическому увеличению уровня экспрессии пенициллинацилазы.

Присутствие нескольких шаперонов может давать синергический эффект, как было показано для некоторых белков [66]. В литературе упоминаются следующие шапероны: TF, DnaK, DnaJ, GroEL, GroES, GrpE. Шаперон TF

проявляет активность пептидилпролил-цис/транс-изомеразы и препятствует агрегации растущей полипептидной цепи [66].

В статье [67] рассмотрено влияние шаперона SecB на фолдинг и итоговый уровень активной ПА. Цитоплазматический шаперон SecB относится к Sec-системе транспортировки белков *E.coli*, то есть отвечает за правильный фолдинг полипептидной цепи в процессе транспортировки белка в периплазму.

Исследование роли DegP в экспрессии гена пенициллинацилазы показало, что DegP проявляет протеолитическую активность и препятствует накоплению рекомбинантного белка с неправильной структурой [68]. Первоначальная функция белков теплового шока состоит в улучшении физиологии клетки *E.coli* [68]. Одновременная экспрессия генов ПА и DegP в присутствии двух индукторов IPTG и арабинозы практически полностью исключает образование телец включения. Такой же эффект наблюдался в работе [65].

Как было замечено в обзорной статье [62], правильный фолдинг рекомбинантного белка представляет важную фундаментальную задачу, решение которой обеспечивает успешный практический результат.

Фолдинг полипептидной цепи происходит за несколько миллисекунд [69]. Изучать процесс фолдинга можно с помощью таких методов, как малоугловое рентгеновское рассеяние, динамическое рассеяние света, флуоресценция резонансного переноса энергии, спектроскопия ядерного магнитного резонанса [69]. Движущая сила процесса сворачивания неупорядоченной полипептидной цепи в нативную третичную структуру – это стремление системы, то есть молекулы белка, к минимуму энергии Гиббса. Поверхность потенциальной энергии в этом случае выглядит как воронка. Это означает, что количество возможных вариантов протекания фолдинга уменьшается по мере приближения к нативной конформации [70]. В качестве примера в статье [70] приводится сравнение фолдинга второго PDZ-домена тирозинфосфатазы и его пермутированной формы.

2.6. Рефолдинг белков из телец включения

2.6.1. Рефолдинг: общие положения

Согласно обзору [71], 40% лекарственных препаратов на основе биологических макромолекул продуцируют в клетках *E.coli*, представляющих наиболее изученную, эффективную и экономически выгодную систему экспрессии, обладающую многочисленными преимуществами для промышленного применения. Биосинтез рекомбинантных белков в системе экспрессии на основе штаммов *E.coli* может осуществляться в двух режимах, в растворимой форме с конечной локализацией в цитоплазме или периплазме клетки *E.coli*, или в виде нерастворимых телец включения в цитоплазме клетки *E.coli*. Последний режим применим только для белков, не требующих посттрансляционной модификации. Получение терапевтических белков в виде телец включения широко применяется в промышленности. К главным достоинствам относятся высокие выходы экспрессии, $1,3 \text{ г} \cdot \text{мл}^{-1}$ по сравнению с экспрессией растворимых белков ($0,5-0,8 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$), и высокая чистота белка до 90%, что упрощает дальнейшую очистку [71].

Эффективность процесса восстановления белка из телец включения зависит от условий двух главных этапов, солюбилизации и непосредственного рефолдинга [71, 72]. Солюбилизирующим агентом может выступать мочеви́на, гуанидингидрохлорид либо сильные ионные детергенты, такие как додецилсульфат натрия [73] и N-лауроилсаркозин [72], а также не являющиеся детергентами сульфобетаины [74].

Рефолдинг определяется балансом между формированием нативной структуры и гибкостью или растворимостью денатурированного состояния и конкурирует с неправильным сворачиванием и агрегацией белка. Основной причиной агрегации служат гидрофобные взаимодействия, сила которых увеличивается с повышением температуры. Для исключения агрегации во время рефолдинга понижают температуру, уменьшают концентрацию солюбилизованного белка, проводят рефолдинг в присутствии денатурирующих агентов [74]. К различным методам рефолдинга относятся одностадийный диализ, ступенчатый диализ, гель-фильтрация, разбавление и обратное разбавление,

смешивание в постоянном соотношении раствора денатурированного белка и раствора для рефолдинга [72]. Для улучшения рефолдинга используют добавки, уменьшающие агрегацию (полиэтиленгликоль, циклодекстрин, аргинингидрохлорид, пролин, гистидин, β -аланин, додецилсульфат натрия, ионная жидкость нитрат этиламмония, полиэтиленгликоль, поливинилпирролидон) и способствующие правильному фолдингу (сахара, полиолы, соли сульфат аммония и хлорид магния, аминокислоты глицин и аланин) [72, 73].

Денатурирующие агенты применяются как для солубилизации белков в высоких концентрациях, так как способствуют полному разрушению внутри- и межмолекулярных взаимодействий за счет электростатических взаимодействий с заряженными аминокислотными остатками, но также и для подавления агрегации при рефолдинге белка при низких концентрациях денатурирующего агента за счет повышения растворимости экспонированных гидрофобных участков и взаимодействия с ароматическими и отрицательно заряженными группами аминокислотных остатков [73].

2.6.2. Рефолдинг пенициллинацилазы

В литературе упоминается, что белки, требующие посттрансляционный процессинг, обычно денатурируют необратимо, и в связи с этим очень сложно осуществить рефолдинг [56]. Немногочисленные публикации по рефолдингу ПА представляют практическое изучение возможности и процесса рефолдинга. При этом исходным источником фермента выступает очищенный и растворимый активный препарат фермента, а не тельца включения. Для рефолдинга применяли как денатурированную в мочеvine ПА, так и смесь субъединиц, предварительно разделенных методом ПААГ-электрофореза с 8 М мочевиной либо методом гель-проникающей хроматографии. Например, для ПА из *Providencia rettgeri* после электрофоретического разделения субъединиц совместная ренатурация позволяет вернуть 6-12% исходной активности. При обработке нативного фермента мочевиной и последующем диализе достигалось восстановление 50% активности [26].

В связи с тем, что биосинтез в виде телец включения обеспечивает более высокое количество белка, альтернативным способом получения активной растворимой ПА из *E.coli* как экспрессии целого гена может служить клонирование двух субъединиц (α и β) и их отдельная экспрессия, что теоретически может приводить к формированию телец включения [55]. Работа [55] посвящена денатурации и рефолдингу гетеродимерной ПА из *E.coli*. Денатурацию ПА в растворе мочевины контролировали методами флуоресценции, кругового дихроизма в дальнем УФ и измерением ферментативной активности. Кинетика денатурации ПА соответствует кооперативной структуре белка. Гетеродимерная ПА теряет вторичную структуру при среднем значении концентрации мочевины, или в средней точке перехода, 4,5 М. Полная денатурация ПА достигается при концентрации мочевины 8 М и представляет собой смесь двух денатурированных составляющих α - и β -пептидов. Неудачный рефолдинг ПА объясняется необратимой денатурацией β -субъединицы и неспособностью заново принять нативную конформацию, в то время как денатурация и рефолдинг α -субъединицы представляет собой термодинамически обратимый процесс. На поверхности отдельной α -субъединицы был обнаружен гидрофобный участок, на основе которого происходит фолдинг β -субъединицы *in vivo*. Невозможность рефолдинга *in vitro*, согласно статье [55], была предсказуема и характерна для всех белков, принимающих активную форму в результате посттрансляционной модификации и протеолиза.

Тем не менее в другой работе этого же коллектива ученых [56] попытка *in vitro* рефолдинга ПА из штамма *E.coli* ATCC 11105 оказалась удачной. В работе [56] изучали различные факторы, влияющие на ренатурацию ПА, такие как рН, ионная сила и температура. Описан успешный рефолдинг двух полипептидов в активный гетеродимер. Инкубация очищенной ПА в 8,8 М мочевины при рН 7,5 привела к денатурации α - и β -субъединиц и их диссоциации. Величина рН влияет скорее на сворачивание β -субъединицы, чем на ассоциацию двух субъединиц в гетеродимер. Оптимальный температурный диапазон ренатурации находится в районе 0-17°C, а оптимальная ионная сила достигается при концентрации 0,5-1,5 М

NaCl в 50 мМ фосфатном буфере рН 6,5 при температуре 22°C. Рефолдинг проводили методом диализа против $5 \cdot 10^3$ -кратного содержания боратного буфера, рН 6,5 в течение 24 ч при 4°C, при этом концентрация белка составляла 0,84–2,30 мг·мл⁻¹. Выход активной ПА составил 58%. При этом конформация ренатурированного белка оказалась идентичной по сравнению с нативным ферментом, но удельная активность составила приблизительно 75% от активности нативной ПА, что свидетельствует о более низком содержании активных центров.

Рефолдинг ПА из *E.coli* ATCC 11105 был также проведен в работе [75] в рамках изучения температурной денатурации методом ДСК.

Таким образом, была показана возможность рефолдинга ПА из бактерии *E.coli* после денатурации активного гетеродимера [56]. Тем не менее публикации по теме рефолдинга ПА из нерастворимых телец включения отсутствуют.

2.7. Пермутированные белки

Пермутация в классическом представлении – это реорганизация первичной структуры белка, при которой соединяют исходные N- и C-концы полипептидной цепи и создают новые N- и C-концы в подходящем месте. Как известно, первичная структура белка определяет все остальные типы структурной организации. Правильно смоделированная пермутированная форма белка, в которой конформационное напряжение сведено к минимуму, как правило, не отличается от нативного белка по третичной структуре. Таким образом, пермутация не влияет на трехмерную структуру белка, но может изменять путь фолдинга.

Метод пермутации используется в генетической инженерии для исследования структурно-функциональных взаимодействий белков. Пермутация не оказывает закономерного влияния на трехмерную структуру и свойства белка, и во многом эффект определяется длиной и составом линкера, соединяющего исходные N- и C-концы полипептида либо двух субъединиц. Как правило, пермутированные формы белков сохраняют третичную структуру и функцию [76-81]. Кроме того, такая реорганизация первичной структуры может изменять путь фолдинга. Однако в статье [82] на примере PDZ-домена показано, что механизм фолдинга сохраняется, если пермутация не затрагивает основной центр, отвечающий за

сворачивание полипептидной цепи. Противоположная ситуация наблюдается в случае рибосомного белка S6. Наличие двух центров фолдинга обуславливает изменение порядка фолдинга на обратный в результате пермутации [83].

Согласно литературным данным, пермутация на уровне генно-инженерной конструкции неоднозначно влияет на экспрессию нового гена. В случае аспарагиназа-подобного белка человека сохранялся высокий уровень экспрессии пермутанта, при этом пермутант синтезировался в растворимой форме [79]. Этот пример заслуживает особенного внимания, потому что аспарагиназа-подобный белок, как и пенициллинацилаза, относится к классу Ntn-гидролаз, состоит из двух α - и β -субъединиц и синтезируется в виде неактивного предшественника, который претерпевает внутримолекулярный процессинг. Для эндонуклеазы рестрикции PvuII и шаперонина GroEL [78, 80] пермутированные формы имели такой же уровень экспрессии, что и исходный фермент, и не агрегировали в нерастворимые тельца включения. Противоположная ситуация наблюдалась в случае пермутированных ксиланазы [77] и стрептавидина [81], когда значительная часть экспрессируемого белка накапливалась в нерастворимой форме. Иногда при пермутации наблюдалось повышение уровня экспрессии, например, для молекулярного шаперона термосомы [76].

Сравнительная характеристика работ по пермутации некоторых белков приведена в таблице 2.3, где указана цель применения метода пермутации, расстояние между N- и C-концами белка и состав соединительного линкера.

Существует только одна публикация, описывающая одноцепочечную пермутированную ПА из *E.coli* [86]. В работе [86] в генно-инженерной конструкции пермутированной ЕсПА были удалены четыре аминокислотных остатка с N-конца α -субъединицы (EQSS) и два аминокислотных остатка с C-конца β -субъединицы (QR). Соединительный линкер был получен методом неупорядоченного мутагенеза и представлял собой случайный тетрапептид, имеющий структуру β -поворота. Была получена библиотека, содержащая $1,2 \cdot 10^6$ вариантов пермутированной ЕсПА, из которых 40% подавляло жизнеспособность рекомбинантного штамма *E.coli*. Уровень экспрессии для остальных вариантов был

ниже, чем для фермента дикого типа, и характеризовался величиной удельной активности 3-39% от соответствующего значения для ЕсПА дикого типа с максимальным значением для линкеров следующего состава: GARD (39%), DPAG (35%) и NEGM (22%). Для изучения экспрессии одноцепочечных вариантов ЕсПА в работе [86] были также получены генетические конструкции с сигнальной последовательностью трех типов, в том числе ТАТ-зависимые сигнальные пептиды (нативный сигнальный пептид ЕсПА дикого типа и *TogA*) и *Sec*-зависимый сигнальный пептид β -лактамазы. Синтез активных пермутантов в растворимой форме достигался только при экспрессии в цитоплазме без сигнального пептида либо с участием *Sec*-сигнального пептида, в то время как ТАТ-зависимые сигнальные пептиды приводили к формированию нерастворимых агрегатов пермутированной ЕсПА. Из полученных результатов работы [86] был сделан вывод, что новая организация субъединиц не ухудшает процесс фолдинга одноцепочечной ЕсПА, но может быть несовместима с ТАТ-типом сигнальных последовательностей. Вестерн-блот анализ показал отсутствие протеолиза одноцепочечных вариантов ЕсПА во время экспериментов по экспрессии, а изучение каталитических свойств свидетельствует о сходных значениях каталитической константы для двух пермутантов (с линерами NEGM и DPAG) по сравнению с ЕсПА дикого типа [86].

Таким образом, пермутация в целом не изменяет трехмерную структуру белка, но может заметно повлиять на последовательность событий фолдинга полипептидной цепи, на уровень экспрессии белка и может приводить к образованию нерастворимых агрегатов. Как правило, пермутированный белок сохраняет биологическую функцию.

Таблица 2.3.

Пермутация различных белков: цель метода и характеристика соединительного линкера.

Белок	Цель пермутации	Расстояние между N- и C-концами, Å	Линкер	Количество аминокислот в линкере	Ссылка
Аспарагиназа-подобный белок человека hASRGL1 (гетеродимер)	Преодоление неполного автопроцессинга <i>in vitro</i> для структурной и кинетической характеристики белка.	26	GAGSGAGSGAGG	12	[79]
Ксиланаза из <i>Bacillus circulans</i> (мономер)	Определение новых аспектов механизма ферментативной реакции и роли динамики исходных и новых N- и C-концов в структуре и функции фермента.	2,7	G ₀ , G ₁ , G ₂	0; 1; 2	[77]
Эндонуклеаза рестрикции PvuII (гомодимер)	Оценка важности расположения новых N- и C-концов для катализа и возможности создание fusion-конструкций с другими регуляторными доменами.	–	(L0; –GSGG–) L1 (–GSGT–), L2 (–TGSG–).	4	[80]
Шаперонин GroEL (из <i>E.coli</i> ; мономер)	Изучение структурных и функциональных характеристик GroEL, выяснение деталей молекулярного механизма GroEL.	–	Val-Asp	2	[78]
Стрептавидин (тетрамер)	Исследование роли амида Asn49 в стабилизации высокоаффинного комплекса с биотином.	–	GGGS	4	[81]
Молекулярный шаперон – термосома из <i>Methanocaldococcus jannaschii</i> (rTHS); TEM-1 β-лактамаза	Уменьшение протеолиза рекомбинантных белков при экспрессии в <i>E.coli</i> методом пермутации.	–	GGSGGT	6	[76]

Таблица 2.3.

Пермутация различных белков: цель метода и характеристика соединительного линкера. (Продолжение).

Белок	Цель пермутации	Расстояние между N- и C-концами, Å	Линкер	Количество аминокислот в линкере	Ссылка
Рибонуклеаза барназа	Инженерия ферментативной функции и изучение структуры фермента за счет привнесения конформационного напряжения в структуре.	27,2	Cys; (GGS) ₅ GTM	1; 18	[84]
Щелочная фосфатаза из <i>E.coli</i>	Создание ферментной метки для иммуноанализа на основе бифункционального пермутанта с присоединенным эпитопом маркера метаболизма костей BGP (bone gla protein).	–	(G ₄ S) ₃	15	[85]
Пенициллинацилаза из <i>E.coli</i>	Исключение посттрансляционного процессинга и повышение уровня экспрессии.	5	случайный тетрапептид	4	[86]
Дигидрофолатредуктаза из <i>E.coli</i>	Определение функциональной роли доменов белка. Изучение влияния пермутации на трехмерную структуру, стабильность и активность фермента.	14,5	Gly ₅	5	[87]
TEM-1 β-лактамаза	Модельный белок для получения пермутанта с новой доменной организацией.	–	GGS	3	[88]
β-Субъединица эукариотического сигнального рецептора (SR) из <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Кристаллизация и получение дифракционно качественных кристаллов, благодаря уменьшению поверхностной энтропии методом пермутации.	–	GGGSGGG	7	[89]

2.8. Одноцепочечные белки

В литературе есть множество публикаций, касающихся получения одноцепочечных псевдодимерных белков. В основном, эти белки представляют собой антитела и гормоны. В частности, тиротропины и гонадотропины относятся к гетеродимерным гликопротеинам [90]. В статье [90] подчеркивается, что направленный мутагенез этих гормонов часто оказывает влияние на фолдинг, секрецию и, следовательно, на биологическую активность гормона. Для усиления секреции тиротропина в работе [90] был получен одноцепочечный вариант гормона, в котором α - и β -субъединицы соединены линкером. В качестве линкера использовали С-концевой пептид β -субъединицы хорионического гонадотропина человека (ХГЧ). С другой стороны, было показано, что отдельная экспрессия α - и β -пептидов внутри одной клетки позволяет получить функциональный гетеродимер практически с количественным выходом [90]. Успешность экспериментов по отдельной экспрессии двух субъединиц определяется типом системы экспрессии (эукариотическая и прокариотическая) и особенностью фолдинга и третичной структуры белка.

Подход, основанный на получении одноцепочечных пептидных гормонов, позволяет исследовать роль тех или иных аминокислотных остатков в функционировании гормона методом направленного мутагенеза, что не представляется возможным в случае нативного гетеродимера. Для хорионического гонадотропина человека было показано, что введение мутаций приводит к неспособности α - и β -субъединиц ассоциировать, а, следовательно, к отсутствию биологической активности [91]. Соединение двух субъединиц в одноцепочечный белок изменяет характер их взаимодействия за счет изменения конформации, отличающейся от нативного гетеродимера, но при этом сохраняет функциональность белка [91]. Мутагенез на основе одноцепочечного гонадотропина позволил определить ключевые аминокислотные остатки, отвечающие за взаимодействие α - и β -субъединиц, их ассоциацию и связанную с этим биологическую активность [91]. Одноцепочечные аналоги гормонов имеют

терапевтическое значение, так как характеризуются увеличенным периодом полураспада в плазме крови [91].

Тем не менее, подход, при котором исходные гомо- или гетеродимеры преобразуют в одноцепочечный белок, не всегда приводит к желаемому результату. Например, в статье [92] сообщается, что одноцепочечный вариант хорионического гонадотропина из *Equus caballus* уступает по биологической активности, эффективности связывания с рецептором и продуктивности экспрессии.

В работе [93] изучали взаимосвязь между продуктом трансляции гена одноцепочечного варианта ХГЧ и его фолдингом, а соответственно и трехмерной структурой. Методом спектроскопии кругового дихроизма было показано, что два одноцепочечных варианта отличаются по вторичной структуре от нативного гетеродимерного ХГЧ, но в то же время сохраняют свою биологическую активность. Согласно статье [93], порядок трансляции полипептидной цепи имеет важное значение, и первая транслируемая субъединица сворачивается в менее упорядоченную и компактную структуру, что подтверждали данные КД-спектроскопии и метода ограниченного протеолиза.

Метод соединения двух белков в один полипептид успешно использовали в работе [94] для изучения процессов репликации и транскрипции вирусного генома бычьего вируса папилломы на примере белка Р2. Все одноцепочечные гетеродимерные варианты этого белка сохраняли исходную биологическую активность. На основании данного факта можно утверждать, что одноцепочечный вариант белка приобретает правильный фолдинг, обеспечивающий выполнение функции.

Эффективность экспрессии одноцепочечного псевдодимера зависит от природы белка и системы экспрессии. Например, для стрептавидина было показано, что его одноцепочечная форма экспрессируется в *E.coli* BL21(DE3) под контролем Т7 промотора в виде нерастворимых телец включения (1 мг белка на 1 л среды) [95].

В работе [96] был получен нециклический пермутант для фактора транскрипции Argc-репрессора. Пермутант экспрессировался в *E.coli* в растворимой форме, характеризовался такой же термодинамической стабильностью и кинетикой рефолдинга, как и исходный одноцепочечный вариант.

Получение одноцепочечных рекомбинантных антител представляет собой отдельную область исследований. Применение метода ковалентного соединения двух полипептидных цепей в случае антител позволяет изучать термодинамическую стабильность мультидоменных белков, используя переменный фрагмент антител (Fv) в качестве модельной системы [97]. Одноцепочечные переменные фрагменты (sc-Fv) служат альтернативой полноразмерным антителам в иммунотерапии опухолей, их главные преимущества состоят в экономической практичности и относительной простоте конструирования бифункциональных антител на их основе методом генетической инженерии [98]. В обзоре [98] подробно рассмотрены системы экспрессии для одноцепочечных антител. Сравнение множества вариантов экспрессии рекомбинантных sc-Fv позволяет делать выбор в пользу эукариотических систем экспрессии, так как в бактериях sc-Fv имеют тенденцию к формированию нерастворимых телец включения и, кроме того, отсутствует гликозилирование белков [98].

2.9. Стабильность пенициллинацилазы

Оптимальная температура гидролиза пенициллина G – 50°C [99]. Поэтому для эффективности соответствующих промышленных процессов требуются биокатализаторы (ПА) с высокой температурной стабильностью.

ПА-G из *Achromobacter xylosoxidans* обладает повышенной термостабильностью по сравнению с ПА из других источников. Согласно результатам работы [12], причиной высокой термостабильности является большое число солевых мостиков в молекуле фермента, высокое содержание остатков аргинина на поверхности молекулы белка, а также остатков пролина и низкий уровень остатков глутамина и аспарагина, высокий процент остатков аланина в α -спиралях. Остатки пролина придают конформационную жесткость полипептидной цепи и таким образом стабилизируют структуру. Остатки аланина в

составе α -спиралей способствуют большей прочности вторичной структуры. Остатки Ala стабилизируют отдельную α -спираль. Высокое содержание Ala в α -спиралях внутри белковой глобулы приводит к гидрофобизации этих участков полипептидной цепи и к усилению гидрофобных взаимодействий как внутри субъединицы, так и между α - и β -субъединицами ПА. Одна ионная пара может составлять 13-22 кДж·моль⁻¹ свободной энергии фолдинга. Солевые мостики не разрушаются при высоких температурах и тем самым обеспечивают структурную стабильность. Высокая термостабильность ПА из *A.xylosoxidans* также может быть обусловлена высоким содержанием остатков Arg на поверхности белковой молекулы за счет образования водородных связей с близлежащими полярными остатками. Пролин характеризуется уникальной геометрией и ограничивает конформационную подвижность полипептидной цепи. Кроме того, Pro может стабилизировать α -спираль, увеличивая ее гидрофобность. Остатки пролина понижают энтропию разворачивания и в целом стабилизируют структуру белковой молекулы [12].

Ионные пары – одна из причин повышенной термостабильности фермента. Количество солевых мостиков для ПА из *B.badius*, *A.xylosoxidans*, *E.coli* и *P.rettgeri* 526, 506, 478 и 392 соответственно [12, 16]. Изучение кинетики термоинактивации ПА из *E.coli* при разных рН свидетельствует, что стабильная конформация ПА обеспечивается тремя солевыми мостиками [100]. При их разрушении фермент претерпевает конформационный переход и приобретает нестабильную структуру [100]. На примере супероксиддисмутазы из *Pseudoalteromonas haloplanktis* была продемонстрирована положительная роль ионных мостиков на поверхности молекулы белка в повышении температурной стабильности [101]. В статье [101] также отмечается, что конформационная подвижность молекулы белка напрямую связана с термостабильностью, а в случае ферментативной активности часто наблюдается обратная взаимосвязь.

В работе [75] была изучена термоденатурация ПА из *E.coli* методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК). В качестве переменных параметров выступали рН буферного раствора, скорость сканирования и

концентрация мочевины. Было показано, что термоденатурация ПА является необратимым процессом, а температура денатурации зависит от скорости нагрева и pH. Максимум температуры денатурации фермента ЕсПА наблюдался в области pH 6-7, близко к изоэлектрической точке pI. В соответствии с моделью Ламри-Эйринга процесс термоденатурации ПА включает три стадии, а именно обратимое разворачивание α -субъединицы, диссоциацию димера на составляющие субъединицы и необратимую денатурацию β -субъединицы. С другой стороны, было обнаружено, что препарат ПА, претерпевший одно сканирование, успешно сворачивается заново при рефолдинге. В работе [75] также исследовали влияние мочевины на термоденатурацию ПА и установили, что повышение концентрации мочевины приводит к снижению температуры денатурации. Там же упоминается, что процесс термоденатурации ПА не зависит от концентрации фермента и представляет собой реакцию первого порядка. Было установлено, что α -субъединица играет роль главной кооперативной единицы при денатурации ПА, при этом для активации денатурации белка необходимо полное разворачивание α -субъединицы.

Термостабильность ПА связана с конформационной подвижностью молекул белка в водных растворах и может быть повышена при добавлении нейтральных солей, сахаров и глицерина [32].

В статье [102] описана гетерологичная экспрессия ПА из термофильного микроорганизма *Thermus thermophilus* (TthПА) в цитоплазме мезофильной клетки *E.coli*. Изучено влияние ко-экспрессии шаперонов (DnaK/J, GrpE, TF, GroEL/ES) и наличия кальция в среде для культивирования. Рекомбинантную ПА анализировали методом SDS-ПААГ электрофореза и MALDI-TOF масс-спектрометрии. Оптимальный pH активности TthPA – pH 4, фермент TthПА проявляет высокую температурную стабильность. Оптимальная температура функционирования 75°C, период полуинактивации при 75°C – 9,2 ч; субстратная специфичность – пенициллин К (октаноилпенициллин), такая же, как у ацилаз из *Streptomyces lividans* и *Actinoplanes utahensis*. Наиболее термостабильные ПА

проявляют специфичность больше к алифатическим пенициллинам (пенициллин К и дигидро F), чем к ароматическим пенициллинам (G и V) [99].

В работе [103] в рамках поиска потенциально термостабильных ПА-G проведено сравнение первичной последовательности и структур шести ПА-G из различных источников: *E.coli*, *A.faecalis*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Sphingomonas wittichii*, *Paracoccus denitrificans* и *Acinetobacter oleivorans*. Выбор трех последних ферментов основан на наличии остатков Cys в положениях, эквивалентных AfПА, которые могут образовать дисульфидную связь; для них построены модельные структуры. После компьютерного скрининга выбранных ферментов для экспериментального изучения была выбрана ПА из *Paracoccus denitrificans*, поскольку этот фермент показал похожие параметры термостабилизации по сравнению с ПА из *A.faecalis* и *A.xylosoxidans*, в том числе наличие дисульфидной связи, высокое соотношение аминокислотных остатков Arg/Lys, большое количество стабильных сетей ионных пар, более высокое содержание остатков Pro, особенно в β -поворотах и низкое содержание термолабильных остатков и связей. Таким образом, был клонирован *pdpga*-ген ПА-G из почвенной денитрифицирующей грамотрицательной бактерии *Paracoccus denitrificans* PD1222, проведена экспрессия и очистка фермента, а также характеристика термостабильности. Оптимум pH для ПА из *P.denitrificans* – pH 10, температурный оптимум 45°C. Фермент ПА из *P.denitrificans* проявлял низкую термостабильность и полностью инактивировался при температуре 45°C за 20 мин [103].

В качестве факторов термостабилизации могут выступать дисульфидные связи, водородные связи, энтропийная стабилизация остатками Pro, развернутая сеть ионных пар, высокая величина отношения количества остатков Arg/Lys. Остатки Arg более предпочтительны при высоких температурах, чем остатки Lys, из-за резонансной стабилизации боковых цепочек вместе с более широкой площадью поверхности для взаимодействия зарядов. Остатки Pro обладают жесткой конформацией и обеспечивают стабилизацию за счет энтропийного эффекта, обычно остаток Pro вводят во второе положение β -поворотов в петлях. Другим критерием термостабильности является низкое содержание связей Asn-Gly

и термолабильных остатков Asn и Gln, так как они претерпевают спонтанное деамидирование при повышенных температурах. Деамидирование Asn до остатков аспартата или изо-аспартата приводит к нарушению функциональности белков. Среди других термолабильных аминокислотных остатков можно выделить незаряженные полярные остатки Ser и Thr [103].

Наиболее общепринятыми методами изучения термостабильности белков, согласно статье [104], являются дифференциальная сканирующая калориметрия и изотермическая денатурация. В статье [104] был предложен новый метод изучения термостабильности – ИК-спектроскопия с преобразованием Фурье (FT-IR). Метод позволяет следить за динамикой структуры белка в процессе термоденатурации.

Кроме температурной стабильности белков важное значение имеет рН-стабильность, которая играет роль в пептидном синтезе. В работе [105] проведен биоинформатический анализ структуры ПА из *E.coli* с целью изучения рН-индуцируемой денатурации фермента в водной среде в щелочных условиях. Было показано, что специфические положения аминокислот для Ntn-гидролаз – β Asn20, β Glu482 и β Asp484 (для EcПА) – стабилизируют взаимодействия между двумя антипараллельными β -листами в структурном $\alpha\beta\alpha$ -домене, β 1- β 2- β 11- β 12 и β 6- β 5- β 4- β 3, отвечающие за стабильность ПА [105]. Такие взаимодействия включают плотную сеть из водородных связей между аминокислотными остатками и молекулой растворителя внутри структуры белка. При щелочных рН происходит существенная дестабилизация нативной конформации EcПА из-за разрушения данной сети взаимодействий. Благодаря замене β Asp484 (в EcПА) на β Asn480 (в AfПА), фермент AfПА более стабилен при щелочных рН, чем EcПА [105].

2.10. Культивирование штаммов-продуцентов пенициллинацилазы.

На данный момент опубликовано много статей, посвященных поиску оптимальных условий культивирования штаммов-продуцентов ПА, которые обеспечили бы максимальный выход фермента. Ключевые параметры, по которым отличаются эти условия, – это тип штамма-продуцента, вектор, промотор, тип и объем среды, индуктор, концентрация индуктора и время индукции, температура и продолжительность культивирования (табл. 2.4). Основные проблемы при

культивировании клеток *E.coli* – это накопление рекомбинантного белка в виде телец включения, внутриклеточный протеолиз белков и клеточный лизис.

Для синтеза рекомбинантной ПА разработаны различные системы экспрессии на основе прокариот – штаммов бактерии *E.coli* как наиболее распространенные [64, 65, 67, 106-114], бактерий *Bacillus megaterium* [115-120] и *Bacillus subtilis* [29], а также на основе эукариот – дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* [33] и *Pichia pastoris* [121], особенностью которых является гликозилирование продукта.

Многочисленные публикации по культивированию различных штаммов-продуцентов ПА посвящены оптимизации состава и pH среды для культивирования [108], а также условий культивирования, а именно температура после индукции [106], ко-экспрессия шаперонов [64, 67, 110, 111], добавление кофакторов [61].

Регуляция биосинтеза пенициллинацилазы может осуществляться следующими промоторами: *T7* [65, 110], *tac* [44, 122, 123], *trc* [65, 124], *araB* [64], *rhaBAD* [109], *xylA* [119]. В качестве индуктора выступают IPTG для *T7*, *tac*, *trc*; арабиноза, рамноза и ксилоза для *araB*, *rhaBAD* и *xylA* соответственно.

Таблица 2.4.

Сравнительный анализ литературных данных по культивированию ПА.

Фермент	штамм-продуцент	Вектор	промотор	Среда	Объем среды, мл	Процент посевого	Индуктор	концентрация индуктора	время индукции	температура	Продолжительность культивирования	Выход белка, ед/л среды	Ссылка
<i>A.faecalis</i> CICC AS1.767	<i>Bacillus subtilis</i> WB600	pMA5	HpaII	-	50	1%	Без индукции	-	-	37°C	86	653	[29]
<i>A.faecalis</i> CICC AS1.767	<i>Bacillus subtilis</i> WB600	pMA5	HpaII	-	2500	6%	Без индукции	-	-	37°C	60	546	[125]
<i>A.faecalis</i> CICC AS1.767	<i>E.coli</i> JM109(DE3)	pET24a(+)	T7	-	50	6%	IPTG	0,5 мМ	A600=0,6	37°C	3	150	[29]
<i>A.faecalis</i>	<i>E. coli</i> JM109(DE3)	pET24a(+)	T7	LB	-	-	IPTG	1 мМ	A600=1,0	28°C	3	270	[126]
<i>A.faecalis</i> ATCC 19018	<i>E.coli</i> JM109	pJOE2702	rhaBAD	-	5000	10%	рамноза	2 г/л	70-80% потребления глюкозы	27°C	20	4520	[109]
<i>A.faecalis</i> NCTC 415	<i>E.coli</i> HB 101	-	-	LB	-	-	IPTG	1,0 мМ	поздняя log-фаза	28°C	24	-	[31]
<i>A.faecalis</i> ATCC 1908	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	pMMB207	tac	M9	-	-	IPTG	0,5 мМ	-	28°C	7	-	[122]
<i>A.faecalis</i> AS1.767	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	pET28a(+)	-	LB	100	1%	IPTG	1 мМ	A600=0,6	30°C	4	-	[127]
<i>A.faecalis</i> AS1.767	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	pET43.1a(+)	-	LB	50	2%	IPTG	1 мМ	A600=0,6	30°C	4	10897	[128]
<i>A.faecalis</i> NCTC 415	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	pMMB207	tac	M9 модифицированная	50	-	IPTG	0,5 мМ	A600=0,8	28°C	16	14000	[61]
<i>K.citrophila</i>	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	pET24(+)	T7	YE	-	-	IPTG	0,5 мМ	после 15 ч культивирования	30°C	6	13460	[129]
<i>E.coli</i> ATCC 11105	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	pMMB207	tac	M9	40	-	IPTG	0,5 мМ	-	28°C	10	-	[123]
<i>E.coli</i> ATCC 11105	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	pMMB207	tac	M9	-	-	IPTG	0,5 мМ	A600=0,1	28°C	4	-	[44]
-	<i>E.coli</i> JM109	pTrcKn29S	trc	LB	1000	2%	IPTG	0,1 мМ	A600=0,1	28°C	50	150	[124]

2.10.1. Системы экспрессии на основе бактерий

Обычно экспрессию пенициллинацилазы осуществляют в клетках *E.coli*. Например, в статье [130] для экспрессии гена ПА из *Achromobacter* sp. ССМ 4824 использовали штамм *E.coli* BL21. Препаративное культивирование биомассы осуществляли в течение 22 ч. Количество синтезированного фермента составило 0,9 г/л белка, или 20% растворимого белка клетки *E.coli* BL21 [130]. Экспрессию фермента ПА из *Kluyvera cryocrescens* с His-тагом на С-конце полипептида проводили с плазмиды pET26b(+) в *E.coli* BL21(DE3) pLysS [41]. Помимо клеток *E.coli* возможно применение и других штаммов микроорганизмов.

Экспрессию *pac*-гена можно проводить также и в клетках *Bacillus subtilis* [20, 34]. Система экспрессии на основе штамма *Bacillus subtilis* WB600 описана в статье [29]. Биосинтез ПА в *B.subtilis*, сопровождается секрецией фермента во внеклеточное пространство, а в случае *E.coli* фермент находится в периплазме. Особо подчеркивается тот факт, что *B.subtilis* не подходит для экспрессии ПА из грамотрицательных бактерий.

В работах [117-120] в качестве рекомбинантного штамма-продуцента использовали клетки *Bacillus megaterium* и исследовали влияние компонентов среды, а именно типа источника углерода и азота на выход активного фермента. Было показано, что при культивировании штамма *Bacillus megaterium* особое значение имеет наличие в питательной среде свободных аминокислот, за исключением ароматических (Phe, Tyr, Trp) [117, 119, 120], а в качестве источника углерода для роста биомассы *B.megaterium* наиболее эффективны глюкоза и глицерин, но при этом подавляется биосинтез фермента [120]. Концентрация компонентов среды также влияет на выход активного фермента. Например, набор из аминокислот, наиболее важных при культивировании *B.megaterium*, – Ala, Asp, Gly, Ser, Arg, Thr, Lys, Glu) в концентрации 10 мг·мл⁻¹ повышает выход белка, а при 20 мг·мл⁻¹ – понижает. Было показано, что при высоких концентрациях (20 г·л⁻¹) глицерин подавляет синтез фермента на 50% [131]. Для сравнения можно отметить, что при культивировании различных штаммов *E.coli* использовали

глицерин в качестве единственного источника углерода в небольших концентрациях (2–5 г·л⁻¹) в работах [67, 110].

В качестве альтернативного продуцента ПА также может выступать выделенный из почвы бактериальный штамм *Bacillus* sp. PGS10 [132]. Работа [132] описывает оптимизацию среды для культивирования грамположительной бактерии *Bacillus* sp. В качестве параметров для оптимизации были выбраны температура (26-34°C), величина pH среды (pH 5,0-9,0) и концентрация следующих компонентов среды: гидрофосфат калия, сульфат магния, хлорид кальция, фенилуксусная кислота, триптон, дрожжевой экстракт, сахароза. В результате был найден оптимальный количественный состав среды, а также установлено, что температурный оптимум культивирования составляет 28°C, а оптимум pH – pH 7,0.

2.10.2. Системы экспрессии на основе дрожжей

Кроме систем экспрессии, основанных на бактериальных штаммах *E.coli*, *B.megaterium* и *B.subtilis*, в литературе описано получение ПА при помощи дрожжей. Например, для биосинтеза ПА из бактерий *Providencia rettgeri* применяли *Saccharomyces cerevisiae* [33] и *Pichia pastoris* [121]. Характерная черта грибов как эукариотических систем экспрессии заключается в гликозилировании итогового продукта. Частичное гликозилирование небольшой части ПА в *S.cerevisiae* по сравнению с более высоким уровнем гликозилирования в *P.pastoris* объясняет более высокую термостабильность ПА, экспрессируемой дрожжами *P.pastoris*. В работе [33] проведена оптимизация культивирования дрожжей *S.cerevisiae* CBL1-30, продуцента ПА из *P.rettgeri* (PrПА), по двум параметрам: концентрация индуктора (галактоза; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0%) и время индукции (A_{600nm} ; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 единиц поглощения). Уровень экспрессии высокий и составляет 21% рекомбинантного белка от общего растворимого белка клетки (6700 Ед·л⁻¹), а процент секретируемой PrПА – 80% (5400 Ед·л⁻¹). Поддержание pH среды на одном уровне (pH 6,5) позволяет снизить время культивирования до 24 ч [33]. Фермент оказался частично гликозилирован по α -субъединице, по данным изоэлектрофокусирования фермент состоит из шести изоформ с изоэлектрической точкой pI=4,6-5,2.

2.10.3. Оптимизация факторов биосинтеза пенициллинацилазы

Температура культивирования – один из ключевых факторов, от которого зависит выход активной и растворимой ПА. Обычно культивирование проводят при низких температурах (22-28°C). Более высокая температура (37°C) приводит к накоплению ПА в виде нерастворимых телец включения [106]. Системы экспрессии на основе клеток *E.coli* используются для биосинтеза ПА при пониженных температурах (обычно 28°C), а при повышенных температурах 33-37°C синтезируется очень мало белка.

В работе [133] система экспрессии pUT18/*E.coli* MDP7 позволяет экспрессировать *pac*-ген PrПА при температуре 37°C с относительно высокой итоговой объемной активностью, если в среду добавлять глицерин. Такой же уровень экспрессии в клетках *E.coli* MDP7 наблюдался и при температуре культивирования 28°C и 33°C, но без добавления глицерина. Таким образом, добавление глицерина в среду не всегда приводит к повышению выхода рекомбинантной PrПА, и в некоторых случаях отрицательно влияет на выход фермента и подавляет экспрессию [133]. При температуре 37°C несмотря на высокий выход по активности, по данным SDS-электрофореза в полиакриламидном геле, значительное количество фермента образует нерастворимые тельца включения [133]. Также в этой работе [133] проводили оптимизацию гетерологичной экспрессии *pac*-гена ПА из *Providencia rettgeri* ATCC 31052 в мутантном штамме *E.coli* MDP7 под контролем *tac*-промотора по нескольким параметрам: тип штамма-продуцента, температура культивирования (28, 33 и 37°C) и состав среды, а именно источник углерода (фруктоза, глюкоза, глицерин, сорбитол, сахароза). Экспрессионная плазмида pUT18 содержала ген устойчивости к канамицину и *pac*-ген внутри фрагмента размера 2,7 т.п.о., ограниченного сайтами рестрикции *EcoRI/SacI*. Было показано, что глицерин в концентрации до 5 г·л⁻¹ – наиболее перспективный источник углерода по сравнению с глюкозой, которая, как известно, вызывает катаболическую репрессию [133].

В работе [114] изучали влияние состава среды и температуры культивирования клеток *E.coli* BL21(DE3) на синтез ПА из *E.coli* ATCC11105.

Было показано, что при температуре культивирования 20°C выход ПА по удельной активности в шесть раз выше, чем при 28°C. Оптимизированные условия культивирования: индуктор лактоза, продолжительность культивирования 24 ч после индукции при температуре 20°C; качественный состав среды: глицерин, триптон, дрожжевой экстракт, сульфат магния, дигидрофосфат калия, гидрофосфат натрия, хлорид аммония, сульфат натрия.

Генно-инженерные штаммы *E.coli*, основанные на ко-экспрессии периплазматических белков теплового шока *degP* и *fkpA* [64, 110, 111] и цитоплазматического шаперона *SecB* [67] позволяют улучшить производительность культивирования. В работах [112, 113] описана система экспрессии в клетках *E.coli* с выделением рекомбинантной ПА во внеклеточное пространство, что упрощает последующую очистку фермента.

2.11. Очистка пенициллинацилазы

В фармацевтической промышленности при получении β-лактамовых антибиотиков используется ПА в иммобилизованном виде. Для обеспечения экономичности процесса получения биокатализатора и высокой эффективности катализа требуется высокоочищенный препарат фермента с высокой удельной активностью. Около 30-40% стоимости биокатализатора составляет стадия очистки, а именно два параметра: коэффициент очистки, – чистота препарата, – и выход активного белка [134].

Поиску наиболее эффективного метода очистки посвящено множество научно-исследовательских работ, где описана разработка различных методов и методик очистки белка. Среди них фракционирование сульфатом аммония, один либо комбинация двух-трех типов хроматографии. Многообразие возможных вариантов хроматографической очистки определяется в основном типом носителя. В таблице 2.5 показана краткая схема очистки ПА из разных источников.

Таблица 2.5.

Сводная таблица методов и характеристик очистки ПА из различных источников.

Источник ПА	Тип хроматографии	Носитель	Выход, %	Кратность очистки	Ссылка
<i>Alcaligenes</i> sp.	анионообменная, катионообменная, гель-фильтрация	DEAE-Sepharose, SP-Sepharose, Superose HR12.	13	н.д.*	[135]
<i>A.faecalis</i> CICC AS1.767	анионообменная	DEAE-Sepharose CL-6B	81	86,4	[29]
<i>Alcaligenes faecalis</i>	аффинная	Co-IDA agar	27,6	40	[126]
<i>Alcaligenes faecalis</i>	аффинная	Ni-NTA agarose	н.д.	н.д.	[136]
<i>Alcaligenes faecalis</i> NCTC 415	анионообменная	MonoQ	14	48	[31]
<i>Bacillus megaterium</i>	ультрафильтрация, фракционирование сульфатом аммония, гель-фильтрация	UF (cut-off 50 kDa), сульфат аммония 20-80%, Sephadex G-100	15	6,22	[137]
<i>Escherichia coli</i>	аффинная	ИМАС аффинная мембрана на основе целлюлозы с иммобилизованными ионами Cu^{2+}	90,25	9,11	[138]
<i>Escherichia coli</i>	ионообменная	CM Sepharose	97	3,5	[139]

Таблица 2.5.

Сводная таблица методов и характеристик очистки ПА из различных источников. (Продолжение).

Источник ПА	Тип хроматографии	Носитель	Выход, %	Кратность очистки	Ссылка
<i>Escherichia coli</i>	ионообменная	карбоксиметилэтилендиамин агароза (CM-EDA)	>70	>98%	[140]
<i>Escherichia coli</i>	гидрофобная хроматография с индуцированием заряда (HCIC).	4-меркаптоэтилпиридин (4-MEP) Hypercel	70,67	3,465	[141]
<i>Escherichia coli</i>	гидрофобная	phenyl–Sepharose gel	74	2,4	[142]
<i>E.coli</i> NCIM 2400	гидрофобная, анионообменная	Phenylglycyl-Sepharose, DEAE- cellulose	56	49	[143]
<i>Escherichia coli</i>	анионообменная	MonoQ	н.д.	н.д.	[144]
<i>Providencia rettgeri</i>	гидрофобная; анионообменная, гель- фильтрация	Phenyl Sepharose, Q Sepharose, Sephacryl HR 200	73	64,7	[121]
<i>Providencia rettgeri</i>	гидрофобная; анионообменная	HiLoad 16/10 phenyl Sepharose high performance; HiLoad 16/10 Q Sepharose Fast Flow column	72	20,8	[33]

*н.д. – нет данных.

В статье [139] приводится сравнение двух методов очистки ПА – ионообменной хроматографии и водной двухфазной системы (aqueous two-phase system; ATPS) и рассматриваются технический и экономический аспекты очистки фермента. К преимуществам водной двухфазной системы для очистки ПА из бесклеточного экстракта клеток *E.coli* ATCC 9637 относятся: высокий выход фермента (97%) по сравнению с хроматографической очисткой (48%) и сокращение количества этапов очистки с семи до четырех. Было показано, что водная двухфазная система более эффективна для частичной очистки фермента на первом этапе по сравнению с ионообменной хроматографией и характеризуется на 37% более низкой стоимостью [139].

В работе [12] очистка ПА из *Achromobacter xylosoxidans* включала сочетание двух разных типов хроматографий, гидрофобной хроматографии (phenyl Sepharose CL-4B; Amersham Pharmacia Biotech) и ионообменной хроматографии (MonoQ HR5/5; Amersham Pharmacia Biotech). Перед второй стадией очистки активные фракции были сконцентрированы методом ультрафильтрации (cut-off 30 кДа) и переведены в другой буферный раствор (20 mM Tris-HCl; pH 7,5) [12].

Следует отметить, что на стадии осаждения белков сульфатом аммония (80%) часть фермента ПА из *A.viscosus* инактивируется и выход составляет 79,6% [19]. Похожий результат наблюдается в другой работе [13], когда схема очистки ПА из *Bacillus megaterium* помимо адсорбционной хроматографии (Celite) и катионообменной (карбоксиметилцеллюлоза) включает два этапа высаливания сульфатом аммония, причем на каждом этапе происходит коагуляция белка в виде нерастворимого материала на поверхности жидкости, что приводит к потере активного фермента примерно на 17% [13].

Методика очистки ПА из *Bacillus megaterium* ATCC14945, которая секретруется во внеклеточную среду, отличается от обычной схемы для периплазматических ПА и позволяет получить гомогенный белок (95% гомогенности) за одну стадию катионообменной хроматографии на носителе SP-Sepharose HP (GE Healthcare) с предварительной фильтрацией надосадочной жидкости на фильтре PVDF (поливинилиденфторид) с размером пор 0,45 мкм.

Фермент был сконцентрирован до 8-10 мг·мл⁻¹ в центрифужном фильтре (10 кДа cut-off, Amicon, Millipore) [39].

Очистку ПА-G также можно проводить методом аффинной хроматографии с иммобилизованными ионами металлов (ИМАС; immobilized metal affinity chromatography) и с помощью аффинных мембран (ИМАМs, immobilized metal affinity membranes). Принцип данных методов основан на специфическом взаимодействии катионов металлов за счет координации электронной пары с электронодонорными аминокислотными остатками на поверхности белка (His, Cys, Trp, Asp, Glu) [138]. Основные преимущества мембранного процесса в отличие от обычной колоночной хроматографии – низкое ограничение массопереноса за счет отсутствия диффузии частиц, низкое падение давления и простота масштабирования.

В статье [138] для очистки ПА-G предложены мембраны на основе регенерированной целлюлозы с IDA (иминодиуксусная кислота) в качестве хелатирующего агента для иммобилизации катионов металлов. В рамках работы были изучены факторы очистки, такие как природа металла, температура, pH и концентрация хлорида натрия. Было протестировано семь ионов металлов (Cu²⁺, Ni²⁺, Co²⁺, Zn²⁺, Ca²⁺, Fe³⁺, Al³⁺), из них катион железа обеспечивал самый высокий фактор очистки и удельное сродство, а катион меди – емкость адсорбции. Одностадийная очистка ПА-G из бесклеточного экстракта клеток *E.coli* характеризовалась 90,25% выходом, а кратность очистки составила 9,11 раз.

Есть некоторые статьи, описывающие очистку рекомбинантной ПА из *Bacillus badius* с His-тагом методом Ni-NTA-аффинной хроматографии [16]. Еще один пример, где бесклеточный экстракт с 6His-тагом на C-конце полипептида очищали методом аффинной хроматографии на носителе Ni-IDA агарозе, при этом выход составил 89% [18]. Очистку ПА из *K.cryocrescens* ATTC21285 с His-тагом на C-конце полипептида проводили в два этапа: аффинная хроматография (Ni-Sepharose) и гель-фильтрация на Sephacryl S-200 [41].

К достоинствам аффинной хроматографии можно отнести высокую оперативность, когда очистка фермента проводится за один этап с высоким

выходом по активности. Недостаток ИМАС-хроматографии состоит в использовании токсичных тяжелых металлов, что ограничивает применение метода в биофармацевтике [141].

Альтернативой аффинной хроматографии может служить последовательность из нескольких хроматографий другого типа. Например, в работе [17] очистка ПА из *Kluyvera cryocrescens* ATTC 21285 включала фракционирование сульфатом аммония, гидрофобную хроматографию на Octyl Sepharose, анионообменную хроматографию на Q-Sepharose и гель-фильтрацию на носителе Sephadex G-100. Данная методика очистки позволяет получить фермент с выходом 38%. Для очистки был использован бесклеточный экстракт [17].

Для ПА из *Achromobacter viscosus* 8895GU [19] очистка состояла из осаждения белков сульфатом аммония до 80% и четырех типов хроматографий, гидроксипатит, CM Sephadex, DEAE-целлюлоза и гель-фильтрация на Sephacryl S-200. Выход фермента составил 6,7%.

Очистка фермента ПА-V из *B.sphaericus* включала фракционирование сульфатом аммония сначала 30% и затем 60% от насыщения, анионообменную хроматографию DEAE-Sephadex A50 и гидрофобную хроматографию на Octyl-Sepharose CL-4B. На колонку с гидрофобным носителем фермент наносили в концентрации 24% (w/v) от насыщения сульфата аммония. Выход составил 15% [145].

ПА из *Kluyvera cryocrescens* ATCC21285 локализована в периплазме, и очистка также включала осмотический шок и осаждение сульфатом аммония. Если сравнивать общее содержание ПА в клетке штамма-продуцента *E.coli* ATCC 11105, полученное после разрушения целых клеток ультразвуком, с количеством фермента после осмотического шока, то рекомбинантная ПА составляет 60% общего белка периплазмы. Дальнейшая очистка ПА включала одну стадию гель-фильтрации на носителе Ultrogel® AcA44 [45].

Сложная четырехэтапная очистка была использована для ПА из *Proteus rettgeri* [23], а именно три стадии ионообменной хроматографии и стадию гель-

фильтрации. Фермент из бесклеточного экстракта очищали методами анионообменной хроматографии (DEAE-С, DEAE-целлюлоза), катионообменной хроматографии (SP-Sephadex), анионообменной хроматографии (DEAE-Sephadex) и гель-фильтрации (Sephadex G-150). Выход составил 9%, при этом препарат после очистки остался неомогенным и содержал примеси [23]

В работе [33] описана трехстадийная очистка ПА из *Providencia rettgeri*, продуцируемой дрожжами *S.cerevisiae*. Очистка включала фракционирование сульфатом аммония и комбинацию двух типов хроматографии, гидрофобной HiLoad 16/10 phenyl Sepharose и ионообменной HiLoad Q-Sepharose. Выход активной PrПА составил 72%, а кратность очистки 20,8. Согласно SDS-ПААГ электрофорезу, фермент содержит примеси, что можно объяснить посттрансляционной модификацией в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* [33].

Кроме обычных хроматографических методик применяются различные типы хроматографии смешанного режима, например, комбинация гидрофобных и ионных групп на одном носителе, смеси разных носителей либо смеси двух и более функциональных лигандов. Например, в статье [140] описано одновременное использование катионо- и анионообменных носителей, преимуществом которых является возможность адсорбции при других условиях, не подходящих для адсорбции на стандартных ионообменных носителях с исключительно одним видом ионизуемых групп, положительных или отрицательных. Учитывая, что максимальная адсорбция белка достигается при условиях, близких к его изоэлектрической точке, смешанный носитель адсорбирует белки за счет формирования сети ионных мостиков между носителем и белком, что приводит к усилению адсорбции и количества адсорбированного белка и, следовательно, обеспечивает высокую степень очистки. Данный метод применяли для очистки ПА из экстракта клеток *E.coli* с помощью носителя на основе карбоксиметилагарозы 4BCL, частично модифицированной этилендиамином, содержащей смесь карбокси- и аминогрупп. Выход фермента составил более 70%, а чистота – более 98% [140].

Традиционные методы очистки белков относятся к наиболее изученной системе экспрессии на основе клеток *E.coli*. Белки, продуцируемые клетками *E.coli*,

имеют внутриклеточную локализацию, и перед очисткой требуются дополнительные манипуляции, включая разрушение клеток ультразвуком для получения бесклеточного экстракта либо методом осмотического шока для выделения периплазматической фракции, фракционирование сульфатом аммония, концентрирование, обессоливание и перевод в другой буферный раствор для хроматографии. Таким образом, процесс подготовки фермента для очистки становится многостадийным и невыгодным с экономической точки зрения. Поэтому кроме клеток *E.coli* для упрощения очистки используют гетерологичную экспрессию фермента в грамположительном штамме бактерии *Bacillus subtilis* [29] и в генноинженерных штаммах *E.coli* [112, 113], которые секретируют фермент во внеклеточное пространство, или среду для культивирования.

В статье [112] разработана система штамм *E.coli*/вектор для экспрессии и секреции рекомбинантной ПА. В мутантном штамме *E.coli* JE5505 отсутствовал ген *lpp*, кодирующий липопротеин муреин. Для культивирования были протестированы несколько сред, удовлетворяющих значению ионной силы (проводимости) $5-7 \text{ мСм} \cdot \text{см}^{-1}$ и содержащих низкопроводящие компоненты. Данные условия необходимы для очистки анионнообменной хроматографией на носителе Q Sepharose. Фермент ПА не связывался с носителем и элюировался в первом пике. После очистки фермент содержал примесные олигопептиды (32%), однако авторы посчитали, что чистота полученного фермента достаточна для промышленного применения. В другой публикации [113] описано создание интегрированной схемы с минимальным количеством этапов для прямой очистки внеклеточно продуцируемой рекомбинантной ПА с использованием тангенциальной проточной фильтрации и анионообменной мембранной хроматографии TFF-AEMC (tangential flow filtration and anion-exchange membrane chromatography). Выход активной ПА составил 75% с 2,6-кратным фактором очистки.

На примере ПА из грибов *Penicillium chrysogenum* [146] продемонстрирована одностадийная очистка из бесклеточного экстракта методом псевдоспецифичной аффинной хроматографии, где в качестве лиганда выступает

метакрилоилантипирин. Носитель получали сополимеризацией этиленгликольдиметакрилата и псевдо-аффинного лиганда как со-мономера. Достоинство метода заключается в отсутствии необходимости химической активации носителя для иммобилизации лиганда. Среди других преимуществ псевдо-аффинной адсорбции можно отметить простоту, универсальность и низкую стоимость носителя, а также мягкие условия элюирования, что позволяет сохранить биологическую активность фермента. Разработанный метод [146] обеспечивает высокий выход фермента (93%) по сравнению с традиционными многостадийными методиками. Например, в статье [135] описана четырехэтапная методика очистки ПА из периплазматического экстракта бактерий *Alcaligenes* sp., включающая осаждение сульфатом аммония и три этапа хроматографии на носителях DEAE-Sepharose, SP-Sepharose, Superose 12, при этом выход фермента составил 13%.

Очистку ПА можно также проводить методами гидрофобной хроматографии – гидрофобных взаимодействий (HIC; hydrophobic interaction chromatography) и индукционного заряда (HCIC; hydrophobic charge induction chromatography) [141]. Основное отличие между данными типами хроматографии заключается в условиях элюирования белка, понижение концентрации соли (сульфата аммония) в случае HIC и pH-контролируемый процесс отталкивания разноименных зарядов лиганда и фермента для HCIC. В статье [141] для очистки ПА из бесклеточного экстракта *E.coli* ATCC 9637 исследован новый носитель HCIC-хроматографии с 4-меркаптоэтилпиридином в качестве лиганда, изначально предназначенный для очистки антител. В условиях 0,5 М сульфата аммония (0,02 М фосфат натрия, pH 7) на стадии связывания с носителем и элюирования при pH 4 (50 мМ ацетат натрия) выход составил 92,94% при 4,215-кратной очистке. Показано, что разработанный метод подходит для биофармацевтических целей.

Таким образом, очистка ПА, как правило, многоэтапная и может осуществляться как из бесклеточного экстракта клеток штамма-продуцента, так и из культуральной среды. Гидрофобная хроматография обычно применяется в сочетании с другими типами хроматографии, а ионообменная и аффинная

хроматография для белков с His-тагом могут применяться как единственная стадия очистки.

2.12. Применение пенициллинацилазы

ПА применяется в фармацевтической промышленности для получения полусинтетических β -лактамных антибиотиков и для энантиоселективного разделения оптически активных изомеров. Публикации по данной теме посвящены инженерии пенициллинацилазы для синтеза конкретного антибиотика, разнообразным вариантам иммобилизации, хиральной жидкостной хроматографии, где ПА иммобилизована на носителе. Итоговая цель данных разработок – получение продукта, имеющего значение для медицины.

2.12.1. Полусинтетические β -лактамные антибиотики

Промышленные ферменты часто используют в иммобилизованном виде, что продиктовано по большей части экономическими соображениями. Так как ПА широко применяется в фармацевтической промышленности, множество научных исследований посвящено иммобилизации пенициллинацилазы, а именно поиску актуального типа носителя, способа и эффективного метода иммобилизации [147]. Иммобилизация фермента на носителе обеспечивает его повторное использование за счет возможности в любой момент отделить его от реакционной смеси, а также позволяет повысить операционную и температурную стабильность фермента. Научно-исследовательские разработки позволяют получить биокатализатор с более низкой себестоимостью, что делает промышленный процесс экономически выгодным. В случае ПА предпочтение отдается, как правило, методу ковалентной иммобилизации [148].

Для иммобилизации ПА требуется высокоочищенный препарат с максимально возможной удельной активностью [149], поэтому очистка фермента – не менее важный этап при получении биокатализатора. Однако стоит отметить, что мнения ученых по этому вопросу отличаются. Например, в одной из работ [150] высокая степень очистки ПА приводила к понижению стабильности фермента при иммобилизации.

Исследования по иммобилизации ПА направлены на улучшение каталитических свойств фермента и эффективности синтеза (S/H) в реакции синтеза некоторых цефалоспоринов [22, 151].

Ранее сообщалось [147], что иммобилизация ЕсПА на носителе Eupergit® С приводила к уменьшению величины k_{cat} , что, вероятно, было связано с диффузионными ограничениями для субстрата и с ингибированием продуктом. И если активность препарата возрастала при разрушении иммобилизованного препарата, то отношение синтеза – гидролиза (S/H) оставалось более низким по сравнению с растворенным ферментом. Таким образом, величина S/H не связана с диффузионными ограничениями и является неотъемлемым свойством иммобилизованного фермента. Величина S/H зависит от природы фермента и от условий реакции: pH, температура, концентрация реагентов, ионная сила, добавки (соразтворители, комплексообразующие реагенты) [147]. Скорость реакции сильнее зависит от температуры, чем скорость диффузии, поэтому понижая температуру можно снизить вклад диффузионных ограничений в итоговую скорость реакции [147]. В статье [147] было высказано предположение, что понижение величины S/H связано с изменением микросреды фермента после иммобилизации. Сравнение полученного биокатализатора в работе [147] с результатами работ, опубликованных ранее, показало, что его эффективность, а именно удельная активность (Ед·г⁻¹) в пять раз выше. Результат свидетельствует о том, что при иммобилизации следует использовать белок, максимально свободный от примесей.

Процесс иммобилизации может приводить к частичной потере активности, которая обусловлена необратимой инактивацией части активных центров либо понижением величины k_{cat} фермента [152]. Более низкие значения каталитической константы были связаны с диффузионными ограничениями и ингибированием продуктом. Возрастание активности иммобилизованного фермента при разрушении носителя, вероятно, свидетельствует о неблагоприятной пространственной ориентации молекулы фермента относительно носителя,

недоступности активного центра и о пространственных затруднениях, при которых ограничены изменения конформации.

Понижение активности фермента может быть связано как с уменьшением величины k_{cat} , так и с полной необратимой инактивацией активных центров части молекул фермента [147].

В статье [152] получали сшитые агрегаты AfПА и EcПА (CLEAs). Выход при иммобилизации составил 53-58%, что соответствует потере активности иммобилизованного препарата на более, чем 40%. Иммобилизация AfПА на носителе Eupergit C сопровождалась потерей активности на 10%, особенно при низкой нагрузке поверхности носителя. В результате было показано, что диффузионные ограничения определяют общий выход по активности при иммобилизации фермента.

При иммобилизации важным моментом оказывается ориентация белковой глобулы, а следовательно, и активного центра, по отношению к носителю. Прежде всего, это связано с доступностью активного центра для субстрата. Данная особенность иммобилизации ПА может быть причиной понижения эффективности синтеза (S/H) при получении антибиотиков. В работе [153] использовали сайт-направленный мутагенез для введения остатков лизина на противоположной поверхности относительно активного центра ПА. Было показано, что в данном случае физико-химическая природа и тип носителя не влияют на эффективность синтеза (S/H) биокатализатора. Подобный метод использовали ранее в работе [151], где к C-концу β -субъединицы присоединили гексапептид из чередующихся остатков лизина и глицина. Данный подход позволил улучшить эффективность иммобилизации ПА. В статье [151] также было сделано предположение, что гексапептид приводит к структурным изменениям, затрагивающим активный центр фермента, что объясняет более низкую стабильность по сравнению с нативным ферментом. С другой стороны, гексапептид обеспечивает правильную ориентацию фермента по отношению к носителю, о чем свидетельствует более высокое значение отношения синтеза-гидролиза (S/H) по сравнению с нативным ферментом и коммерческим препаратом.

Ряд статей посвящен оптимизации процесса иммобилизации ПА. Так в работе [154] была изучена зависимость выхода при иммобилизации от концентрации реагентов, в том числе глутаральдегида, фенилуксусной кислоты и тетрагидробората натрия. Эти факторы влияют как на температурную, так и на рН-стабильность иммобилизованного фермента. Также было показано, что присутствие конкурентного ингибитора, фенилуксусной кислоты, защищает активный центр фермента при иммобилизации при щелочных значениях рН [154].

Один из методов иммобилизации, где молекула фермента связывается с носителем через несколько якорных аминокислотных остатков посредством коротких мостиков-полипептидов, называется многоточечным ковалентным связыванием [154]. Для достижения максимальной эффективности иммобилизации в данном случае следует учитывать концентрацию белка и количество связей фермент – носитель. Неверный выбор параметров может привести к перегрузке носителя, пространственным помехам и искажению трехмерной структуры белка и, соответственно, активного центра. В результате были найдены следующие оптимальные условия иммобилизации ПА: 5% глутаральдегид, 100 мМ фенилуксусная кислота в отсутствие тетрагидробората натрия NaBH_4 . Иммобилизованный фермент в пять раз более термостабилен, чем неиммобилизованный препарат. Более высокая величина K_m относительно литературных данных может быть связана с меньшей доступностью активного центра для субстрата либо со структурными изменениями фермента в процессе иммобилизации.

В работе [155] иммобилизовали клетки кишечной палочки (*E.coli* DH5 α), содержащие фермент АфПА. В материалах и методах описывается метод, позволяющий получить пористые шарики с равномерным размером и формой. Рассеяние фермента было исключено обработкой бифункциональным агентом – глутаральдегидом. Клетки, обработанные цетилтриметиламмонийбромидом (СТАВ), иммобилизовали на поливиниловом спирте, сшитом борной кислотой и глутаральдегидом. Иммобилизованный фермент проявлял более высокую

удельную активность, термостабильность, операционную стабильность и рН-стабильность в щелочной области рН.

Нанопоры мезопористой силикатной пены способствуют повышению термостабильности и стабильности при хранении благодаря стабилизации структуры белка [156]. Внутри нанопор белок достаточно ограничен в пространстве, и в результате смена конформаций и разворачивание затруднено. Белок принимает конформацию, требуемую для оптимального катализа. Часто ферменты проявляют более высокую активность и стабильность, когда они заключены в некую ограниченную среду вроде клетки. Методом FT-IR спектроскопии доказано, что изменений во вторичной структуре нет. Улучшение свойств иммобилизованной ПА по сравнению с нативной объясняется взаимодействием белка с заряженной поверхностью нанопор.

Объем пор носителя при ковалентной иммобилизации ПА также имеет большое значение. Как было показано в работе [157], существует некий оптимальный размер пор, при котором остается достаточно пространства для молекул субстрата, промежуточных продуктов и растворителя. При этом в статье [157] подчеркивается, что ковалентная иммобилизация ферментов лучше всего отвечает требованиям промышленности при создании биокатализаторов, в то время как иммобилизация методом адсорбции приводит к появлению следов фермента в реакционной среде.

В работе [158] ПА иммобилизовали на золь-гель матрице с магнитными свойствами. Носитель представлял собой механически прочный материал, основанный на пористой силиконовой матрице с размером пор 30 мкм, по данным сканирующей электронной микроскопии. Выход иммобилизации составил 95-100% по сравнению с 10%, по данным, опубликованным ранее. Выход по активности составил 50-65% при 37°C. В статье приводятся несколько причин, ответственных за потерю активности при иммобилизации фермента. Для данного типа иммобилизации характерно образование метанола по всему объему пространственной сетки золь-гель матрицы. А именно из каждой молекулы тетраметоксисилана в процессе гидролиза и конденсации образуется четыре

молекулы метанола. Дополнительные эксперименты по термостабильности фермента в присутствии метанола показали, что метанол ускоряет кинетику инактивации фермента при повышенных температурах. Снижение активности также может быть связано с физической потерей катализатора (до 19,3% потери изначальной массы). С другой стороны, в процессе конденсации и при высыхании геля происходит некоторое сокращение пор, в результате чего уменьшение объема пор создает стерические помехи для белковой глобулы и провоцирует физический стресс. Матрица сама по себе может стареть по причине утраты механической устойчивости, что выражается в понижении операционной стабильности [158].

В литературе имеются данные по систематическому изучению кинетики реакции синтеза β -лактамных антибиотиков, катализируемой пенициллинацилазой [130].

Выход антибиотика зависит от соотношения трех реакций: S , синтез антибиотика; h_1 , гидролиз ацильного донора (карбокси-эфир или амид); h_2 , гидролиз синтезированного антибиотика. Количество синтезированного антибиотика зависит от соотношения скорости синтеза антибиотика (v_S) и скоростей двух нежелательных реакций: гидролиза ацильного донора (v_S/h_1 ; S/H), а также гидролиза антибиотика (v_S/h_2). Величина параметра v_S/h_1 зависит от концентрации β -лактамного ядра и характеризует способность катализатора адсорбировать субстрат в активном центре [22]. Для оценки свойств фермента в реакциях синтеза антибиотиков применяются параметры S/H , α и P_{Smax} . Эффективность биокатализатора можно выразить величиной S/H . Селективность фермента по отношению к гидролизу продукта или активированного ацильного донора количественно выражается параметром α . Параметр α равен отношению константы специфичности гидролиза антибиотика $(k_{cat}/K_m)_{Ps}$ к константе специфичности гидролиза ацильного донора $(k_{cat}/K_m)_{AD}$. Величина P_{Smax} означает максимальное количество антибиотика, образующееся в реакции синтеза антибиотика [130].

Для синтеза полусинтетических β -лактамных антибиотиков в промышленности используют иммобилизованный препарат фермента, как правило,

ПА из *E.coli*. Проводится поиск новых источников ПА, клонирование и характеристика свойств, а также мутагенез фермента дикого типа с целью улучшения каталитических свойств, термостабильности и операционной стабильности, что очень важно при получении антибиотиков в промышленном масштабе.

Таким образом, существуют альтернативы широко распространенной ЕсПА, которые также находят применение при получении пенициллинов и цефалоспоринов. Например, в статье [22] описана иммобилизованная ПА из бактерии *Arthrobacter viscosus*, и синтез некоторых цефалоспориновых антибиотиков (цефамандол, цефоницид и цефазолин). Для синтеза некоторых β -лактамных антибиотиков в работе применяли иммобилизованный препарат ПА из *Achromobacter* sp. ССМ 4824, Fermase NA[®]-150 [130]. Например, синтез амоксициллина осуществляли при температуре 27,5°C и рН 6,25. Остаточная активность ферментного препарата после 308 циклов конверсии составила 93,4% от начального значения, что соответствует периоду полуинактивации 2000 циклов конверсии. Степень конверсии составила 90-92%. В работе [130] изучали кинетические параметры фермента ПА из *Achromobacter*.sp. ССМ 4824 в реакциях синтеза ряда β -лактамных антибиотиков. Было установлено, что величина константы субстратной специфичности ПА из *Achromobacter*.sp. ССМ 4824 понижается в ряду антибиотиков амоксициллин > цефадроксил > ампициллин > цефалексин [130]. Эффективность процесса синтеза антибиотиков можно повысить методом направленного мутагенеза соответствующих аминокислотных остатков. Направленный мутагенез ПА из *Bacillus megaterium*, осуществленный в работе [15], позволил повысить эффективность синтеза цефалексина. Цель мутагенеза состояла в повышении сродства лиганда (цефалексина) к ферменту. На основании анализа наложения модельной трехмерной структуры комплекса ВмПА – цефалексин и известной рентгеновской структуры ЕсПА – пенициллин G для направленного мутагенеза были выбраны аминокислотные остатки в 6 Å-окрестности субстрат-связывающего сайта, α Y144, α F145 и β V24, которые соответствуют следующим остаткам в ЕсПА: α R145, α F146, β F24. Перечисленные остатки участвуют в

связывании субстрата посредством водородных связей, вандерваальсовых и гидрофобных взаимодействий. Были получены точечные мутанты $\alpha Y144R$, $\alpha F145Y$, $\beta V24F$, а также двойной мутант $\beta V24F+\alpha Y144R$. Эффекты двух точечных мутаций оказались аддитивными, а величина параметра S/N в три раза выше по сравнению с VmПА дикого типа [15]. В статье [148] был разработан биокатализатор на основе ПА из *Providencia rettgeri*, полностью описан процесс получения биокатализатора, включая экспрессию на основе эукариотической системы экспрессии дрожжей *Pichia pastoris*, очистку на анионообменной колонке HiLoad 16/10 Q Sepharose Fast Flow (Amersham Biosciences, Великобритания) и иммобилизацию на метакриловом полимерном носителе. На примере синтеза цефалексина из 7-АДЦК и D-фенилглицинамида была продемонстрирована применимость разработанного биокатализатора для промышленных процессов [148].

Значительное число статей посвящено разработке и характеристике биокатализатора ПА для синтеза β -лактамных антибиотиков, а также оптимизации реакции синтеза ампициллина [159-161], амоксициллина [162-164] и ряда цефалоспоринов, цефаклора, цефпрозила [165] и в том числе цефалексина [166]. Цефалексин относится к фармакологической группе цефалоспоринов и используется при лечении широкого спектра инфекционных заболеваний и воспалительных процессов. В работе [147] исследовали эффективность (S/N) иммобилизованной ПА в синтезе цефалексина из 7-АДЦК и D-(–)-фенилглицинамида. За счет накопления фенилуксусной кислоты в области активного центра создается градиент pH и закисление микросреды, что негативно влияет на эффективность биокатализа.

В литературе упоминается несколько коммерческих препаратов ПА-G, принадлежащих фирме DSM Anti-Infectives (Делфт, Нидерланды) – Separase-G® – AfПА и Assemblase® – EcПА [152], а также Fermase PA® 1500 – EcПА (Fermenta Biotech Ltd., Индия) [130].

2.12.2. Разделение смеси энантиомеров и энантиоселективный синтез

Обзор [167] рассматривает публикации по энантиоселективности ПА и разделению энантиомеров с ее участием. Разделение смеси оптических изомеров основано на отличии величин константы связывания с ПА для двух энантиомеров, при этом большее значение имеет соответствие структуры энантиомера и сайта связывания. По этой причине, как отмечается в обзоре [167], ПА способна разделить не любые энантиомеры, а только те, которые по-разному связываются ферментом и тем самым распознаются ПА как разные оптические изомеры.

Промышленные процессы с участием ПА относятся к реакциям органической химии. Низкая стабильность ПА в органических растворителях ограничивает ее применение в реакциях органического синтеза [168]. Группе исследователей [168] удалось разработать биокатализатор, способный функционировать в условиях высокой концентрации органических растворителей (90%). Было показано, что высокая концентрация органического растворителя необходима не только для достижения высокого выхода продукта, но и для увеличения энантиоселективности (Е) пенициллинацилазы, а уменьшение температуры протекания реакции до 4°C значительно улучшает эффективность биокатализатора (величина Е достигала 100).

Метод ВЭЖХ с иммобилизованной ПА на эпокси-активированном кварцевом носителе позволяет одновременно сочетать гидролиз пенициллина G и хроматографическое разделение продуктов реакции – фенилуксусной кислоты и 6-АПК [169]. В то же время метод не подходит для гидролиза и разделения рацемата метиловых эфиров кетопрофена, а также супрофена [169].

В работе [170] использовали метод капиллярной жидкостной хроматографии с иммобилизованной ПА в качестве хиральной стационарной фазы для разделения рацемата арилпропионовых кислот, а также энантиомеров кетопрофена, фенопрофена и супрофена. Все перечисленные соединения представляют интерес для фармацевтики. Данный метод был применен для определения (S)-кетопрофена в медицинских препаратах (таблетках). Разработка подобных методов имеет

важное значение для фармацевтической промышленности, потому что некоторые лекарственные препараты представляют собой определенный энантиомер.

Ряд исследований посвящен получению оптически чистых β -аминокислот, которые проявляют биологическую активность [171]. В работе [171] показано, что катализируемое ПА ацилирование рацемата (S)- и (R)-изомеров β -фенилаланина позволяет получить оптически чистый продукт с высокой энантиоселективностью. Оптически чистый β -фенилаланин ((R)- и (S)-изомеры) и его производные применяются в медицине в качестве структурных элементов при синтезе ряда лекарственных препаратов, в том числе антибиотиков анти-*Helicobacter pylori* [171].

В случае полусинтетических β -лактамных антибиотиков также необходим определенный диастереоизомер соответствующего ацильного донора. Тем не менее, синтез антибиотика возможен и из рацемата [172]. Например, для синтеза ампициллина был использован рацемат метилового эфира фенилглицина. (R)- и (S)-диастереомеры ампициллина разделяли методом ВЭЖХ. Было показано, что за селективность фермента к (R)- или (S)-изомеру отвечают два аминокислотных остатка фенилаланина β F24, β F146 [172]. В экспериментах с оптически чистыми субстратами было обнаружено, что некоторые мутанты обладают активностью рацемазы или эпимеразы. Например, (R)-селективные мутанты ПА способны синтезировать (R)-ампициллин из исходного (S)-изомера субстрата, а (S)-селективные мутанты, наоборот, – (S)-ампициллин из оптически чистого (R)-изомера метилового эфира фенилглицина [172]. Результаты, полученные в работе [172], также свидетельствуют, что повышение активности ПА в энантиоселективном синтезе сопровождается ухудшением каталитических параметров в реакции гидролиза субстрата NIPAB.

2.12.3. Пептидный синтез.

Пенициллинацилаза используется в пептидном синтезе. Например, в работе [173] получали дипептиды на основе D-фенилглицинамида, из которых далее синтезировали оптически чистые дикетопиперазины. Имобилизованная ПА применяется в пептидном синтезе для снятия S-Phasm-группы

(фенилацетамидометил; защитная группа цистеина). Рассмотрено влияние органических растворителей, pH и ионной силы на каталитические свойства фермента. Исследована комбинация защитных групп S-Trt и S-Phacm для региоселективного синтеза пептидов, в том числе аналога окситоцина, RGD-4C, T22 [174].

Пептидный синтез требует проведение реакции в условиях щелочных значений pH (около pH 10), что связано с высокой константой кислотности pK_a аминогруппы в водном растворе и требованием наличия аминогруппы в активной непротонированной форме, выступающей в роли сильного нуклеофила. Величина pK_a свободной α -аминогруппы составляет 6,8-7,9 единиц [166], pK_a аминогруппы аминокислот в белках составляет 9,0-9,8 [175]. И для проведения пептидного синтеза требуется фермент, стабильный при $pH > 10$. Публикации [175, 176] описывают направленный мутагенез ПА из *E.coli* с целью повышения стабильности фермента при щелочных значениях pH. Методами рационального дизайна и биоинформатического анализа аминокислотных положений, специфичных для подсемейства Ntn-гидролаз, проведено компьютерное моделирование мутанта $\beta D484N$, его экспрессия, очистка и характеристика свойств. Было показано, что данная мутация приводит к десятикратному повышению стабильности ПА при значении pH 10 за счет поддержания внутримолекулярной сети взаимодействия боковых цепочек аминокислотных остатков, что позволяет поддерживать нативную конформацию фермента. Высокая стабильность мутанта $\beta D484N$ при щелочных значениях pH открывает возможность его применения в пептидном синтезе. Так, было продемонстрировано пятикратное увеличение операционной стабильности в препаративном синтезе производных D-фенилглицина [176]. Конверсия дипептида D-фенилглицил-глицина в случае мутанта $\beta D484N$ составила 80% по сравнению с 17% для фермента дикого типа [175].

Научно-исследовательская работа [176] была выполнена с применением программного обеспечения [177], которое позволяет определять аминокислотные положения, специфичные для подсемейства белков, во всей белковой структуре, и

которое может быть использовано для систематического анализа. Новая программа позволяет анализировать эволюцию ферментов, способна сравнивать гомологичные белки и определять наиболее значимые аминокислотные положения, отвечающие за различные функциональные свойства белка, а также обеспечивает новые направления для белковой инженерии и стратегии рационального дизайна.

2.12.4. Направленная доставка лекарств

ПА-G применяется в системах направленной доставки лекарств, и в работе [178] ПА-G использовалась как модельный фермент при разработке оптических зондов, основанных на самоуничтожаемом линкере. Оптические зонды нацелены на биомаркеры заболеваний. Самоуничтожаемые линкеры применяются при направленной доставке лекарств и в диагностических молекулярных системах, в диагностических зондах [179].

В статье [179] описан дизайн, синтез и активация системы пролекарства, которая генерирует флуоресцентный сигнал посредством FRET-активируемого самоуничтожаемого линкера. Разработано пролекарство, состоящее из специфического иницирующего субстрата, присоединенного к самоуничтожаемому линкеру с парой идентичных флуорофоров и химиотерапевтического лекарства. Так как два флуорофора находятся очень близко друг к другу в интактном пролекарстве, испускаемая ими флуоресценция существенно гасится посредством FRET-процесса. Удаление триггера приводит к быстрому разложению самоуничтожаемого линкера, который отделяет флуорофоры и высвобождает активное химиотерапевтическое средство. Во время дефрагментации линкера FRET-тушение останавливается, и измеряемый флуоресцентный сигнал можно использовать для контроля высвобождения лекарства. В качестве триггера выступает амид фенилуксусной кислоты, который отделяется от системы пролекарства действием модельного фермента ПА-G, а в качестве химиотерапевтического лекарства – камптотecin. Флуоресцентный сигнал количественно коррелирует с количеством высвобождаемого лекарства. Флуоресцентная визуализация в ближнем ИК-диапазоне (NIR) позволяет детектировать молекулярную активность *in vivo* благодаря высокой проницаемости

NIR-фотонов через органические ткани и низкому ауто-флуоресцентному фону. Флуоресцентный диагностический сигнал, образующийся при активации пролекарства посредством FRET-подхода испускает молекулы флуоресцеина при длине волны 520 нм, что не позволяет применение этого подхода *in vivo*. Полученная молекула пролекарства плохо растворима в воде, что ограничивает максимальную концентрацию (выше 100 мкМ). Описанная система пролекарства подходит для *in vitro* исследований, но неидеальна для применения *in vivo* [179].

Показана возможность применения полимерных везикул с ферментом, которые синтезируют *in situ* соединение с антибактериальной активностью, что является эффективным и контролируемым способом борьбы против бактерий. Для получения нанореакторов был использован амфифильный блок-сополимер поли(2-метилоксазолин-блок-поли(диметилсилоксан)-блок-поли(2-метилоксазолин) (PMOXA-b-PDMS-b-PMOXA). Данный полимер самоорганизуется в везикулы, которые инкапсулируют биокатализаторы во внутренние водные полости. Выбранный блок-сополимер характеризуется биосовместимостью, низкой иммуногенностью и токсичностью, а также низкой способностью неспецифически связывать белок. Для проницаемости везикул в отношении субстратов и продуктов использовали бактериальный порин OmpF (Outer membrane protein F), что обеспечивает проницаемость для молекул массой до 600 Да. ПА из *E.coli* была выбрана в качестве модельного катализатора реакции субстратов с образованием антибиотика. А в качестве модельной реакции был выбран синтез цефалексина из 7-АДЦК и метилового эфира фенилглицина. Получены нанореакторы размером 50-255 нм [180].

Работа [181] посвящена разработке полимерных везикул-наноносителей, в которые заключены противомикробные агенты, проявляющие селективность для определенного бактериального штамма и способные реагировать на определенные ферменты. Исследованы химические структурные изменения и профиль высвобождения лекарства при инкубации наночастиц со специфичными ферментами. В качестве таких ферментов были выбраны пенициллинацилаза G и β -лактамаза, которые тесно связаны с бактериальными штаммами, проявляющими

стабильность к лекарственным препаратам. В статье [181] полагается, что оба фермента связаны с бактериальной резистентностью. Направленная доставка лекарств основана на ферментативном разрушении несущей антибиотик везикулы за счет структурной реорганизации носителя, что приводит к локальному высвобождению антибиотика.

В статье [182] описано медицинское применение ПА-G для направленной контролируемой доставки молекул монооксида углерода CO к определенным тканям или клеткам. Разработаны молекулы, выделяющие CO под действием пенициллинацилазы G. Данные молекулы имеют трехчастную структуру и содержат протеаза-специфичный пептид (фенилацетамид, PAA), самоуничтожаемый линкер (*para*-аминобензил, ПАВА; N-метил-1,2-этилендиаминкарбонил) и окси-циклогексадиен-Fe(CO)₃. Процесс выделения CO контролировали методом обращеннофазовой HPLC. Разработанная система была успешно протестирована на эндотелиальных клетках пупочной вены человека *in vitro*. Реакция выделения CO проходит в три этапа: ферментативный гидролиз фенилацетамида, самоуничтожение линкера с образованием интермедиата диенол-Fe(CO)₃, окислительное разрушение интермедиата с выделением CO. Монооксид углерода является важной биологической сигнальной молекулой и обладает большим терапевтическим потенциалом, благодаря противовоспалительному и анти-гипертоническому действию [182].

2.13. Пенициллинацилаза G из бактерии *A.faecalis*.

Первое упоминание о пенициллинацилазе из бактерии *A.faecalis* относится к 1960 г. [2]. Этот фермент относится к классу ПА G и представляет собой гетеродимер, содержащий малую α-субъединицу и большую β-субъединицу.

Ген ПА из *Alcaligenes faecalis* ATCC 19018 был клонирован и секвенирован в 1997 году [30]. В этой же статье была определена масса α- и β-субъединиц методом электроспрей масс-спектрометрии – 23,0 и 62,7 кДа; длина спейсера – 37 аминокислотных остатков, длина сигнального пептида – 26 аминокислотных остатков. Изучение кинетики термоинактивации фермента AfПА при температуре 50°C показало, что этот фермент стабильнее, чем фермент из бактерий *E.coli*.

Авторы [30] объясняют сравнительно высокую термостабильность AfПА наличием дисульфидной связи между двумя остатками цистеина β C492 и β C595. Несколько публикаций относятся к следующим темам: культивирование рекомбинантного штамма *E.coli*, несущего плазмиду с геном AfПА [109], влияние ионов кальция на экспрессию, фолдинг и процессинг AfПА [44, 61], а также повышение выхода активной AfПА с помощью коэкспрессии других генов [128]. Ряд статей посвящен разработке биокатализаторов с улучшенными свойствами для синтеза некоторых антибиотиков: цефалексина [126], цефаклора [183] и ампициллина [136]. В 2009 году была определена рентгеновская структура AfПА (PDB 3K3W). Кристаллизация и разрешение структуры AfПА описаны в статье [38]. Было показано, что AfПА кристаллизуется в двух разных пространственных группах: орторомбической ($C222_1$) и тетрагональной ($P4_12_12$). Анализ трехмерной структуры AfПА показал, что α - и β -цепи гетеродимера образуют пирамидальную структуру. Орторомбическая форма содержит семь β -листов и 25 α -спиралей, а тетрагональная форма – восемь β -листов и 27 α -спиралей [38].

В состав структуры AfПА входит катион кальция, который координируют пять консервативных аминокислотных остатков (α Glu153, β Asp73, β Val75, β Asp76, β Asp252), если сравнивать с EcПА (α Glu156, β Asp336, β Val338, β Asp339, β Asp515) [122]. Каталитический центр AfПА образуют также консервативные остатки (α Ser1, β Glu23, β Ala69, β Asn241). В структуре AfПА (PDB 3K3W) было подтверждено наличие дисульфидного мостика между двумя остатками цистеина β Cys492 and β Cys525 [38], которое предполагалось авторами статьи [30].

Пенициллинацилаза из *A.faecalis*, так же как и другие бактериальные ПА, принадлежит к семейству Ntn-гидролаз. Термин Ntn-гидролазы (гидролазы с N-концевым нуклеофилом) впервые предложен в 1995 году [184]. Типичный фолдинг ферментов семейства Ntn-гидролаз образует $\alpha\beta\beta\alpha$ -ядро, состоящее из двух антипараллельных β -листов, окруженных двумя α -спиралями [38].

По сравнению с EcПА фермент из *A.faecalis* имеет ряд преимуществ, а именно обладает более высокой термостабильностью [30], а его pH-оптимум смещен в область более высоких pH (pH 8-10). Последнее свойство имеет большое

значение при получении оптически чистых β -аминокислот, которые представляют интерес для фармацевтической промышленности. На основе (S)- и (R)-энантиомеров β -аминокислот и их производных получают различные лекарственные препараты, среди них антитромбоцитарные антитела, модификаторы иммунного ответа, противогипертонические средства и противораковые препараты [185]. В частности, стереоизомеры β -фенилаланина применяют при получении противоопухолевых препаратов и антибиотиков. В статьях [185] и [171] описано энантиоселективное ацилирование (R,S)- β -фенилаланина, катализируемое ПА из *E.coli* и *A.faecalis* соответственно. Если сравнивать эффективность конверсии при получении оптически чистых (S)- и (R)-изомеров β -фенилаланина, то максимальная величина конверсии для фермента из *E.coli* – 49,6% – наблюдается при pH 10 (25°C, 45 мин), а для ПА из *A.faecalis* – 49,8% – при прочих равных условиях (25°C, 45 мин) можно получить при pH 11. Поскольку период полуинактивации ЕсПА при pH 10 равен 5 ч, а для АфПА – 24 ч (при pH 11 – 5 ч), фермент из *A.faecalis* является более перспективным в области энантиоселективного синтеза.

Анализ литературных данных говорит о том, что пенициллинацилаза из *Alcaligenes faecalis* представляет собой интересный и перспективный фермент. Изучение его свойств и получение одноцепочечной формы фермента является важной фундаментальной и практической задачей.

III. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

3.1. Материалы

3.1.1. Реактивы

Для генноинженерных экспериментов (ПЦР, рестрикция, лигирование) использовали эндонуклеазы рестрикции *AgeI* (каталожный номер #ER1461), *AccI* (#ER1481), *MunI* (#ER0751), *BglII* (#ER0081), *NdeI* (#ER0581), *HindIII* (#ER0501) и буферы фирмы Thermo Scientific (Литва); ферменты *Pfu* ДНК-полимераза (#EP0501), T4 ДНК-лигаза (#EL0014), смесь дезоксирибонуклеозидтрифосфатов dNTP Mix 2 mM (#R0242) (Thermo Scientific, Литва).

Для электрофореза ДНК использовали реактивы: агароза (biotechnology grade, Helicon, РФ); Tris (>99,8%, ultrapure grade, Хеликон, Россия), ЭДТА динатриевая соль (ч.д.а., Германия), уксусная кислота (х.ч., Реахим, Россия).

При работе со штаммами *E.coli* использовали следующие реактивы: дрожжевой экстракт (Difco laboratories, США), триптон (Panreac Quimica S.A.U., Испания), калия гидрофосфат тригидрат (ч.д.а., Диаэм, РФ), натрия дигидрофосфат дигидрат (ч.д.а., Диаэм, РФ), Antifoam O-60 (Sigma, США), кальция хлорид дигидрат (assay>99% (КТ); Fluka Chemika, Швейцария), хлорид натрия (USP Grade, Хеликон, Россия), глицерин (Panreac Quimica S.L.U., Испания), бактоагар (Difco laboratories, США), хлорамфеникол (USP, assay>99%; Fluka Biochemika, Швейцария), канамицин (molecular biology grade, Sigma, США). Для анализа проб, отобранных при культивировании, использовали Triton X100 (Merck, Германия) и лизоцим (Fluka Biochemika, Швейцария).

Для выделения и очистки белков использовали трис(гидроксиметил)аминометан (Tris), сульфат аммония (х.ч., Диаэм, РФ), дигидрофосфат калия (USP-NF, Panreac Quimica S.L.U., Испания), хлорид калия AppliChem, Panreac Quimica S.L.U., Испания), хлорид натрия, сахарозу (Panreac Quimica S.L.U., Испания).

При подготовке растворов для белкового фореа использовали: Tris, глицин (>99,7%, ч.д.а., Merck, Германия), додецилсульфат натрия (SDS; >99%, AppliChem

Biochemica, Panreac Quimica S.L.U., Испания), акриламид (>98%, extrapure, AppliChem, Panreac Quimica S.L.U., Испания), бисакриламид (>98%, ultrograde, LKB-Produkter AB, Bromma, Швеция), бромфеноловый синий (molecular biology grade, Sigma, США), тетраметилэтилендиамин (TEMED; ос.ч., International Biotechnologies Inc., США), персульфат аммония (ос.ч., molecular biology grade, International Biotechnologies Inc., США), кумасси бриллиантовый синий R-250 (ос.ч., Amresco, США), маркер молекулярной массы PageRuler™ Unstained Protein ladder (Thermo Scientific, Литва), уксусная кислота, этанол-ректификат (96%, х.ч., Реахим, Россия).

Для доведения pH буферных растворов использовали гидроксид калия (ч., Riedel-de Haën, Чехия), гидроксид натрия (>99,2%, фарм., Panreac Quimica S.L.U., Испания), соляную кислоту (х.ч., Реахим, Россия).

п-Нитро-м-карбоксамид фенилуксусной кислоты (NIPAB) – субстрат для определения ферментативной активности пенициллинацилазы, был синтезирован Лавровым М.И. (лаборатория тонкого органического синтеза, Химический факультет МГУ имени М.В.Ломоносова).

3.1.2. Бактериальные штаммы и плазмиды

В работе использовали следующие штаммы бактерий: для клонирования *E.coli* DH5 α и для культивирования *E.coli* TG1, *E.coli* BL21(DE3) CodonPlus/pLysS. Клонирование осуществляли в вектор pET24a(+). В работе также использовали плазмиды на основе pBR322.

E.coli DH5 α : F⁻ Φ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK⁻, mK⁺) *phoA supE44* λ - *thi-1 gyrA96 relA1* (Invitrogen™, ThermoFisher Scientific, США).

E.coli TG1: *supE thi-1* Δ (*lac-proAB*) Δ (*mcrB-hsdSM*)5(rK⁻ mK⁻) [F' *traD36 proAB lacI^qZ* Δ M15] (Agilent Technologies, США).

E.coli BL21(DE3) CodonPlus/pLysS: F⁻ *ompT hsdSB*(rB⁻, mB⁻) *gal dcm* (DE3) pLysS (CamR) (Invitrogen™, ThermoFisher Scientific, США).

3.2. Методы исследования

3.2.1. Моделирование структуры одноцепочечной пенициллинацилазы.

Компьютерное моделирование было проведено в 2009-2010 гг. в сотрудничестве с к.ф.-м.н. Упоровым И.В.

Анализ трехмерной модельной структуры ПА дикого типа AfПА VKM B-1518 (DSM) и моделирование структуры одноцепочечной AfПА (sc-AfПА) проводили с помощью пакета программ "Insight II" (Accelrys Inc., San Diego, CA, USA) на станции молекулярной графики Silicon Graphics. Построение структур одноцепочечных вариантов sc-AfПА проводилось с применением модуля Homology, в котором возможно проводить поиск структур пептидов из базы данных PDB (Protein Data Bank), соединяющих две белковых субъединицы наилучшим способом (с наименьшими искажениями геометрии полипептидной цепи). Приведение структур к равновесию (энергетическая минимизация и молекулярная динамика) осуществлялось с помощью модуля Discover_3. При проведении расчетов методами молекулярной динамики и механики использовалось силовое поле CVFF.

3.2.2. Получение генно-инженерной конструкции

3.2.2.1. Получение гена одноцепочечной AfПА

Генно-инженерные конструкции для двух вариантов одноцепочечной AfПА получали методом ПЦР с помощью *Pfu* ДНК-полимеразы. В качестве матрицы использовали плазмиду с геном AfПА VKM B-1518 (DSM) дикого типа. Синтез фланкирующих праймеров был специально заказан у компании "Синтол". Итоговый ПЦР-продукт длиной 1475 и 1472 п.н. для первого и второго вариантов sc-AfПА соответственно клонировали по сайтам рестрикции *BglII/AccI*. В качестве вектора использовали плазмиду на основе pBR322, содержащую ген одноцепочечной sc-AfПА, полученного ранее Ясной А.С. [186].

Переклонирование двух вариантов в новый вектор pET24a(+) выполняли по сайтам рестрикции *NdeI/HindIII*. Нуклеотидная последовательность каждой плазмиды была подтверждена секвенированием. Подготовка проб для

секвенирования включала упаривание образцов ДНК объемом 3 мкл (~200 нг ДНК) и 0,32 мкл праймера концентрации 10 пмоль·мкл⁻¹ при температуре 60-65°C. Секвенирование ДНК проводили с помощью набора реактивов ABI PRISM® BigDye™ Terminator v. 3.1 с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer (ЦКП "Геном", Россия).

Электрофорез ДНК проводили в 1% агарозном геле в TAE-буферном растворе (Tris-ацетат 40 мМ, ЭДТА 1 мМ, рН 7,6). Очистка ПЦР-продуктов включала электрофорез и выделение из 1% агарозного геля с помощью набора реагентов GeneJET™ Gel Extraction Kit ("Fermentas", Литва) по протоколам фирмы-производителя. Полоску агарозного геля с фрагментом ДНК вырезали скальпелем, помещали в пробирку объемом 1,5 мл и взвешивали. К полоске геля добавляли раствор Binding Buffer в пропорции 1:1. Смесь инкубировали при температуре 55°C в течение 10 мин периодически перемешивая до полного растворения геля. Раствор солюбилизированного геля объемом 800 мкл наносили на очищающие колонки GeneJet и центрифугировали 1 мин 13200 об/мин. Далее к колонке добавляли 700 мкл Wash Buffer с этанолом и центрифугировали 1 мин 13200 об/мин. Для полного удаления буфера дополнительно центрифугировали 1 мин 13200 об/мин. Колонку помещали в пробирку объемом 1,5 мл, в центр мембраны колонки добавляли 50 мкл деионизованной воды (Milli-Q, Millipore, США), инкубировали в течение 1 мин при комнатной температуре и центрифугировали 1 мин 13200 об/мин. Очищенную ДНК хранили при температуре -20°C.

Выделение плазмиды из клеток *E.coli* выполняли с помощью набора реагентов GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit ("Fermentas", Литва) по протоколам фирмы-производителя. Плазмиду выделяли из 10 мл бактериальной культуры. Клетки центрифугировали 5000 об/мин 5 мин при комнатной температуре. Осадок клеток отделили от надосадочной жидкости. Клетки ресуспендировали пипетированием в 250 мкл Resuspension Solution с РНКазой А, добавили 250 мкл лизирующего раствора (Lysis Solution) и перемешали 4-6 раз переворачиванием пробирки, пока раствор не стал вязким и прозрачным. К полученной смеси

добавили 350 мкл нейтрализующего раствора (Neutralization Solution) и перемешали 4-6 раз переворачиванием пробирки до образования белого осадка. Смесь центрифугировали 5 мин 13200 об/мин для осаждения осколов клеток и хромосомной ДНК. Супернатант перенесли на колонку GeneJet Spin Column пипетированием. Центрифугировали 1 мин 13200 об/мин, к колонке добавили 500 мкл Wash Solution и центрифугировали 30-60 секунд 13200 об/мин. Процедуру отмывки повторили еще один раз и дополнительно центрифугировали 1 мин 13200 об/мин для полного отделения от оставшегося Wash Solution. Колонку перенесли в пробирку объемом 1,5 мл, в центр мембраны колонки добавили 50 мкл деионизованной воды (Milli-Q, Millipore, США) для элюции плазмидной ДНК, инкубировали 2 мин при комнатной температуре и центрифугировали 2 мин 13200 об/мин. Очищенную плазмиду хранили при температуре -20°C .

Рестрикцию проводили в течение 1 ч при температуре 37°C . Условия рестрикции фрагмента ДНК одновременно двумя рестриктазами определяли при помощи калькулятора "Double Digest" на сайте компании Thermo Scientific. Методика рестрикции, если не указано иначе: в пробирку объемом 500 мкл помещали 16 мкл деионизованной воды (Milli-Q, Millipore, США), 1 мкл ДНК ($0,5-1 \text{ мкг}\cdot\text{мл}^{-1}$), 2 мкл 10-кратного специального буферного раствора и рестриктазы $10 \text{ Ед}\cdot\text{мл}^{-1}$ ($0,5-2 \text{ мкл}$).

3.2.2.2. Переклонирование гена wt-AfIIA дикого типа из плазмиды на основе pBR322 в вектор pET24a(+)

Препаративную рестрикцию исходной плазмиды с геном wt-AfIIA дикого типа проводили с помощью пары рестриктаз *NdeI* и *HindIII* при следующем содержании реагентов: 10 мкл плазмидной ДНК, рестриктазы *NdeI* (1 мкл) и *HindIII* (0,5 мкл), 2 мкл специального 10-кратного буфера 10X R (red) и 6,5 мкл деионизованной воды (Milli-Q, Millipore, США). Реакционную смесь объемом 20 мкл инкубировали 1 час при температуре 37°C и далее проводили электрофорез в 1% агарозном геле. Электрофорез показал наличие двух полос ДНК размером около 3000 п.н. (вектор) и ~ 2500 п.н. (ген ПА), и по причине очень близкого взаиморасположения этих полос вырезать полоску геля с нужным фрагментом

ДНК оказалось затруднительным. Поэтому было решено проводить переклонирование гена фермента в два этапа, сначала по сайтам рестрикции *NdeI/AgeI* и затем *AgeI/HindIII* в следующих условиях: 10 мкл плазмидной ДНК, *NdeI* (0,5 мкл), *AgeI* (0,5 мкл), 2 мкл буфера 10X O (orange), 7 мкл деионизованной воды. Условия для другой реакции: 10 мкл плазмидной ДНК, *AgeI* (1,0 мкл), *HindIII* (0,5 мкл), 2 мкл буфера 10X R (red), 6,5 мкл деионизованной воды. Время инкубации 1 ч при температуре 37°C. Для аналитической рестрикции использовали по 0,2-0,4 мкл эндонуклеазы рестрикции (10 Ед·мкл⁻¹).

Лигирование выполняли в течение 1 ч при температуре 22°C в многоканальном ДНК-амплификаторе "Терцик" ("ДНК-технология", Россия). Состав реакционной смеси для лигирования: вектор (6 мкл) и вставка (12 мкл) в соотношении 1:2, Т4 лигазный буфер (2 мкл) и Т4 ДНК-лигаза (0,2 мкл концентрации 5 Ед·мкл⁻¹). Для трансформации использовали рубидиевые компетентные клетки *E.coli* (хранение при -76°C) либо готовили новые кальциевые компетентные клетки *E.coli* (хранение при 0°C).

3.2.3. Подготовка компетентных клеток *E.coli*

Делали посев 10 мкл клеток *E.coli* из музея (-76°C) в 4 мл среды 2YT и инкубировали в шейкере Innova[®]44 (New Brunswick[™] Scientific, "Eppendorf", США) в течение 12-14 ч при 37°C и 180 об/мин. Далее делали разведение 140 мкл ночной культуры в 4 мл среды 2YT, инкубировали при температуре 37°C и 180 об/мин в течение 1,5-2 ч до значения поглощения $A_{600\text{nm}}=0,6$ A.U. Клетки помещали в стерильные пробирки объемом 1,5 мл и центрифугировали 5 мин при 5000 об/мин и 4°C. Затем супернатант удаляли и к клеткам добавляли 1000 мкл охлажденного стерильного раствора 50 мМ хлорида кальция. Осадок клеток суспендировали и инкубировали во льду 30 мин, после чего суспензию центрифугировали 5 мин при 5000 об/мин и 4°C и ресуспендировали в 100 мкл 50 мМ хлорида кальция. Клетки инкубировали 3-4 ч во льду. Компетентные кальциевые клетки хранили при температуре 0°C и использовали в день подготовки.

3.2.4. Трансформация компетентных клеток *E.coli*

К 50 мкл компетентных клеток добавляли 0,5 мкл плазмиды или 5 мкл лигазной смеси, перемешивали и инкубировали 30-40 мин во льду. Далее пробирки с клетками инкубировали 2 мин при 42°C в водяном термостате и 2 мин во льду, добавляли 950 мкл среды 2YT и инкубировали 1 час в термошейкере Thermomixer comfort ("Eppendorf", Германия) при 37°C с перемешиванием каждые 15 мин. Трансформированные клетки сеяли на чашки Петри с агаризованной средой. Делали посев с двумя разбавлениями, по 100 мкл и 900 мкл трансформированных клеток, и параллельно ставили отрицательный контроль лигирования (после реакции лигирования вектора без вставки) и отрицательный контроль трансформации (компетентные клетки без плазмиды).

3.2.5. Культивирование рекомбинантного штамма *E.coli*

Культивирование клеток *E.coli* TG1 или BL21(DE3) CodonPlus/pLysS выполняли в конических колбах с отбойниками объемом 1 л в шейкере-инкубаторе "Multitron" (Infors, Швейцария). Условия культивирования одноцепочечной АфПА, если не оговорено особо: среда 2YT (триптон 16 г/л, дрожжевой экстракт 10 г/л, хлорид натрия 5 г/л, pH 7,5), объем среды 100-200 мл, глицерин 5 г/л, хлорид кальция 2 мМ; индукция IPTG 0,1 мМ при $A_{600nm}=0,8$; процент инокулята 10%; температура после индукции 20°C; скорость перемешивания 100 об/мин, время культивирования 20-24 ч. Условия культивирования АфПА дикого типа: среда YE (дрожжевой экстракт 30 г/л, хлорид натрия 5 г/л, pH 7,5), объем среды 100-200 мл, глицерин 5 г/л, хлорид кальция 2 мМ; индукция IPTG 0,1 мМ при $A_{600nm}=0,8$; процент инокулята 10%; температура после индукции 15°C; скорость перемешивания 100 об/мин, время культивирования 65-70 ч. В среду добавляли фосфаты 2,5 г/л (гидрофосфата калия тригидрат 1 г/л, дигидрофосфата натрия дигидрат 1,5 г/л).

Стандартная схема разведений культуры клеток *E.coli* включает посев клеток с чашки Петри или из музея (хранение при -76°C), инкубирование в течение 14 ч при 37°C и 180 об/мин, далее 100-кратное разведение и дальнейшее инкубирование

до величины поглощения $A_{600\text{нм}}=0,8$, а затем 10-кратное разведение последней культуры.

Клетки из 100-200 мл культуры осаждали при температуре $+4^{\circ}\text{C}$ и 6000 об/мин в центрифуге "Eppendorf 5804R" (Германия) без добавления ингибиторов.

Для контроля экспрессии в процессе культивирования отбирали пробы объемом 1 мл. В пробах измеряли поглощение культуры клеток на длине волны 600 нм, а также анализировали на наличие активности в среде, как описано ниже (раздел 3.2.8). Пробоподготовка для анализа активности в бесклеточном экстракте включала суспендирование осадка клеток из 1 мл культуры в 1 мл лизирующего раствора (0,02% Triton X100, 0,1 мг/мл лизоцим, 0,02 М TrisHCl pH 8,0), инкубирование при -20°C не менее 1 ч и перемешивание на вортексе при комнатной температуре в течение 1 ч при 1000 об/мин.

3.2.6. Выделение фермента из клеток *E.coli*

Фермент АфПА дикого типа выделяли из клеток методом осмотического шока [134] по модифицированной методике [187]. Клетки осаждали при температуре $+4^{\circ}\text{C}$ и 6000 об/мин в центрифуге "Eppendorf 5804R" (Германия). Осадок клеток из 100 мл среды суспендировали в 10 мл буфера 1 (20% сахара, 100 мМ Tris-HCl, 10 мМ ЭДТА, pH 8,0; 0°C) и инкубировали во льду в течение 5 мин. Суспензию центрифугировали при $+4^{\circ}\text{C}$ и 5000 об/мин в течение 10 мин. Осадок суспендировали в 10 мл буфера 2 (1 мМ ЭДТА, pH 8,0; 0°C) и инкубировали во льду в течение 5 мин. Суспензию центрифугировали при $+4^{\circ}\text{C}$ и 7000 об/мин в течение 15 мин. К супернатанту добавляли насыщенный раствор сульфата аммония в фосфатном буферном растворе (0,05 М KH_2PO_4 , 0,1 М KCl, pH 8,0) до конечной концентрации 2,9 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. В виде осадка фермент хранили при температуре $+4^{\circ}\text{C}$.

Пермутированную (однопочечную) форму АфПА выделяли из клеток с помощью ультразвукового гомогенизатора Branson Ultrasonic Sonifier® 250CE ("Branson Ultrasonics Corporation", США). После заморозки при -20°C 15 мл клеток подвергали действию УЗ в течение 10 мин при рабочем цикле 50%, при

охлаждении (0°C). Суспензию разрушенных клеток осаждали на центрифуге при +4°C и 11000 об/мин в течение 30 мин. Белки осаждали из бесклеточного экстракта с помощью сульфата аммония, как описано выше.

3.2.7. Очистка ферментов

Очистка фермента AfПА дикого типа и его одноцепочечных форм включала гидрофобную хроматографию (Toyoparl Butyl 650M; TOSOH Corporation, Япония) и ионообменную хроматографию (MonoQ 10/100 GL или MonoQ 5/50 GL; GE Healthcare, США). Стартовый буфер при гидрофобной хроматографии – калий-фосфатный с pH 8,0 (0,05 М KH_2PO_4 , 0,1 М KCl , pH 8,0; 1,5 М сульфат аммония), фермент наносили на колонку при концентрации сульфата аммония 1,5 М, далее промывали буфером с 0,8 М сульфатом аммония (0,05 М KH_2PO_4 , 0,1 М KCl , pH 8,0; 0,8 М сульфат аммония). Затем фермент элюировали в линейном градиенте сульфата аммония 0,8-0 М при помощи калий-фосфатного буфера (0,05 М KH_2PO_4 , pH 8,0). Препарат фермента после гидрофобной хроматографии концентрировали ультрафильтрацией на ячейке Amicon 8050 (мембрана Millipore (США) 10 кДа для wt-AfПА и ультрафильтрационная мембрана "Владипор" (Россия) с селективностью 67 кДа для sc-AfПА) и переводили в Tris-буфер (0,02 М TrisHCl pH 8,0) гель-фильтрацией (Sephadex G25).

Очистку фермента методом ионообменной хроматографии на носителе MonoQ 10/100 GL (объем носителя в колонке 8 мл; CV, column volume) либо на колонке MonoQ 5/50 GL (объем носителя в колонке 1 мл; в зависимости от объема препарата для очистки) проводили по протоколам фирмы-производителя. Сначала колонку уравнивали стартовым буфером (20 мМ Tris-HCl , pH 8,0; 5-10 объемов колонки), затем на колонку нанесли фермент, промыли колонку стартовым буфером до базовой линии (5-10 объемов колонки), после чего поставили градиент объемом 10-20 CV 0-20% элюирующего буфера (20 мМ Tris-HCl , 1 М NaCl , pH 8,0). Пик фермента соответствовал значению градиента около 8-12%.

3.2.8. Измерение активности

Активность пенициллинацилазы определяли на спектрофотометре Shimadzu UV-1800 (Япония) с помощью хромогенного субстрата NIPAB (*n*-нитро-*m*-карбоксиханид фенилуксусной кислоты) по накоплению продукта реакции NABA (*n*-нитро-*m*-аминобензойная кислота; коэффициент экстинкции $\epsilon_{400\text{нм}}=9500 \text{ M}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$), регистрируя поглощение на длине волны 400 нм. В кювету помещали 930 мкл калий-фосфатного буфера (0,01 М KH_2PO_4 , 0,1 М KCl , pH 8,0), 40 мкл 6 мМ раствора NIPAB и 30 мкл фермента. Итоговый объем реакционной смеси в кювете составлял 1 мл, конечная концентрация субстрата NIPAB в кювете была равна $2,4\cdot 10^{-4}$ М. Активность определяли как тангенс угла наклона начального линейного участка кинетической кривой. Одна единица активности определялась как количество фермента, необходимое для гидролиза 1 мкмоль субстрата за 1 мин при температуре 30°C и pH 8,0 в калий-фосфатном буферном растворе (0,01 М KH_2PO_4 , 0,1 М KCl , pH 8,0).

3.2.9. Определение кинетических параметров

Для расчета величины константы Михаэлиса K_m и максимальной скорости реакции V_m измеряли зависимость скорости реакции гидролиза субстрата NIPAB от концентрации субстрата. Для этого брали равные обратные концентрации субстрата в диапазоне 0,5-5 K_m . Расчет проводили методом нелинейной регрессии по десяти точкам. Каждое измерение выполняли в двух повторах.

3.2.10. Титрование активных центров

Концентрацию фермента определяли титрованием активных центров с помощью необратимого ингибитора фенилметилсульфонилфторида (PMSF) по методу [188] и модифицированной методике [31]. Примерную концентрацию рассчитывали исходя из поглощения образца белка на длине волны 280 нм и коэффициента экстинкции фермента ($\epsilon_{280\text{нм}}=1,863$ и $1,852 \text{ мл}\cdot\text{мг}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$ для wt-AfПА и sc-AfПА соответственно). Навеску ингибитора растворяли в изопропанолу и делали серию последовательных разбавлений в изопропанолу. В пробирку объемом 1,5 мл добавляли фосфатный буферный раствор (0,01 М KH_2PO_4 , 0,1 М KCl ,

pH 6,0), фиксированную аликвоту раствора фермента и ингибитор. Общий объем реакционной смеси составлял 500 мкл. Реакционную смесь инкубировали 10 мин при комнатной температуре и измеряли остаточную активность спектрофотометрически с субстратом NIPAB (п. 3.2.8). Концентрацию активных центров определяли методом линейной регрессии из графика зависимости остаточной активности от концентрации ингибитора PMSF как абсциссу точки пересечения прямой с осью X. Каждое измерение выполняли в двух повторах.

3.2.11. Изучение термостабильности

Термостабильность изучали в калий-фосфатном буферном растворе (0,1 М KH_2PO_4 pH 8,0) в диапазоне температур 51-59°C. Пробирки объемом 500 мкл с аликвотой раствора фермента помещали в водяной термостат, и через определенные промежутки времени доставали по пробирке и измеряли остаточную активность, как указано выше (п. 3.2.8.). Продолжительность эксперимента соответствовала трем периодам полуинактивации. Погрешность термостатирования составила 0,25°C. Зависимость термостабильности от концентрации калий-фосфатного буфера в диапазоне 0,02-1,0 М (pH 7,0; 7,5; 8,0) изучали при температуре 56°C. Каждое измерение выполняли в двух повторах.

3.2.12. Изучение термостабильности методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК)

Изучение термостабильности методом ДСК проводили в сотрудничестве с к.б.н. Клейменовым С.Ю.

Эксперименты по ДСК выполняли на дифференциальном адиабатном сканирующем микрокалориметре ДАСМ-4 (Институт биологического приборостроения РАН, г. Пущино, Россия).

Для ДСК пенициллинацилазы дикого типа wt-AfПА было проведено препаративное культивирование рекомбинантного штамма *E.coli* с плазмидой wt-AfПА и очистка фермента методами гидрофобной и ионообменной хроматографии. В результате были подготовлены образцы фермента разной концентрации: 6,0 мг·мл⁻¹, 3,0 мг·мл⁻¹ и 1,5 мг·мл⁻¹. Концентрацию белка в данном случае определяли спектрофотометрически по поглощению на длине волны

280 нм, используя расчетный коэффициент экстинкции $\epsilon_{280\text{нм}}=1,863 \text{ мл}\cdot\text{мг}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$. Фермент находился в калий-фосфатном буферном растворе (0,1 М K_2HPO_4 , pH 8,0). Запись кривых ДСК осуществляли в температурном диапазоне 40-68°C. Базовую линию прибора регистрировали в аналогичных условиях, при этом в обе измерительные ячейки калориметра помещали соответствующий буферный раствор (0,1 М K_2HPO_4 , pH 8,0), который также использовали в качестве образца сравнения, или эталона.

В качестве переменных параметров в рамках данного эксперимента были выбраны скорость сканирования (0,5; 1,0 и 2,0 °C·мин⁻¹ при фиксированной концентрации белка 3 мг·мл⁻¹) и концентрация белка (при фиксированной скорости нагрева 1,0 °C·мин⁻¹).

Экспериментальная кривая ДСК получается с шумами, что требует дополнительной математической обработки. Аппроксимация точек с шумами гладкой линией была проведена с использованием сплайна. Сплайн – это кусочно-непрерывная функция, позволяющая аппроксимировать график по точкам, которая задается полиномом n-ной степени на каждом отрезке. Максимальная степень полинома характеризует степень, или порядок, сплайна.

3.2.13. Изучение pH-оптимума активности

Влияние величины pH буферного раствора на активность изучали при температуре 30°C в диапазоне pH 3-11,5 и при постоянной ионной силе 0,12 М с использованием следующих буферных растворов: 0,01 М ацетат натрия, 0,11 М хлорид калия (pH 3-5); 0,01 М дигидрофосфат калия, 0,11 М хлорид калия (pH 6-8); 0,04 М дигидрофосфат калия, 0,08 М хлорид калия (pH 9-11); 0,03 М дигидрофосфат калия, 0,09 М хлорид калия (pH 11,5). Кюветы термостатировали в течение 10 мин и измеряли активность (п. 3.2.8.).

3.2.14. Электрофорез белков

Электрофорез в денатурирующих условиях выполняли на приборе Mini-Protean Tetra (Bio-Rad, США) по методу Лэммли [189]. Концентрация разделяющего полиакриламидного геля составляла 12%. Электрофорез проводили при постоянном напряжении 70 В в концентрирующем геле и 150 В в разделяющем

геле в течение 100 минут. Гель окрашивали 0,1% раствором кумасси R-250 (40% этанол, 10% уксусная кислота). Пробоподготовка для анализа на растворимый/нерастворимый белок включала центрифугирование аликвоты (50 мкл) 20% суспензии разрушенных клеток, отмывание осадка от растворимых белков и суспендирование осадка в 50 мкл буфера (0,02 М TrisHCl, pH 8,0). Образец разбавляли до объема 15 мкл, добавляли 5 мкл 4-кратного буфера с меркаптоэтанолом (0,2 М TrisHCl, pH 6,8; 4% SDS, глицерин 40%; 5% (v/v) β -меркаптоэтанол) и нагревали при 95°C в течение 10 мин.

3.2.15. Рефолдинг

Рефолдинг одноцепочечных форм пенициллинацилазы проводили по специально разработанной методике.

Для солюбилизации 1 мл 20% суспензии клеточного осадка после культивирования sc-AfПА при температуре 30°C центрифугировали в течение 5 мин при 11000 об/мин и температуре 4°C. Осадок промывали буфером А (0,05 М TrisHCl, pH 7,5), ресуспендировали в 5 мл раствора 8 М мочевины в буфере А и инкубировали 1 ч при 4 С. Супернатант отделяли от осадка центрифугированием (5 мин, 11000 об/мин, 4 С).

Пробные эксперименты по рефолдингу первого варианта sc-AfПА1 проводили по методике обратного разбавления, когда буфер для рефолдинга добавляют к солюбилизированному раствору денатурированного белка в высокой концентрации мочевины (8 М). В четыре фалькона объемом 15 мл поместили аликвоту солюбилизированного фермента sc-AfПА1 в 8 М мочеvine объемом 0,5 мл, добавили раствор 0,1 М хлорида кальция и 10% Triton X100 и буфер для рефолдинга В (0,05 М TrisHCl, 0,15 М NaCl, pH 7,5) до конечной концентрации мочевины 1,0; 1,5; 2,0 и 2,5 М; при этом суммарный объем реакционной смеси был равен 4,0; 2,7; 2,0; 1,6 мл соответственно, а конечная концентрация хлорида кальция и Triton X100 во всех фальконах составила 1 мМ и 0,05% соответственно. Реакционную смесь инкубировали 18 ч при температуре 4°C и измеряли активность.

Рефолдинг второго варианта одноцепочечной sc-AfПА2 проводили по методике прямого разбавления, и с учетом результатов рефолдинга sc-AfПА1 решили расширить диапазон итоговой концентрации мочевины до 0,1-2,5 М. Для этого к раствору для рефолдинга В (0,05 М TrisHCl, 0,15 М NaCl, pH 7,5) добавляли 0,1 М раствор хлорида кальция в буфере В до концентрации 1 мМ, раствор 10% Triton X100 до концентрации 0,05% и аликвоту солюбилизованного фермента. Итоговый объем реакционной смеси был равен 4 мл, разбавление белка составило 40 раз. Конечная концентрация мочевины составила 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,8; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 М; CaCl₂ – 1 мМ, Triton X100 – 0,05%. Реакционную смесь инкубировали 2 ч при 4°C и затем измеряли активность.

IV. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

4.1. Клонирование гена, экспрессия и характеристика рекомбинантной пенициллинацилазы из *Alcaligenes faecalis* дикого типа и ее мутантных форм со случайными мутациями, полученных при клонировании.

Объектом исследования в настоящей работе является пенициллинацилаза из бактерии *Alcaligenes faecalis*. 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.

К настоящему моменту все процессы, связанные с экспрессией гена, фолдингом и процессингом фермента были подробно изучены на примере ПА из *E.coli*. Поиск пенициллинацилаз из других источников имеет цель найти более термостабильный белок с улучшенными каталитическими свойствами. ПА из *A.faecalis* тоже достаточно хорошо изучена. Клонирование нового гена из другого штамма *A.faecalis* в данной работе проводится исключительно из практических соображений для получения патентно-чистого фермента.

4.1.1. Клонирование гена пенициллинацилазы из *A.faecalis*

Ген ПА из *A.faecalis* VKM B-1518 (DSM) клонировали ранее в диссертации Ясной А.С [186]. 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).

Первый этап клонирования заключался в конструировании праймеров. Для этого был проведен поиск известных последовательностей гена пенициллинацилазы из *Alcaligenes faecalis*. В результате было найдено, что в банке данных GeneBank аннотировано три неидентичных нуклеотидных последовательности пенициллинацилазы из разных штаммов бактерии *Alcaligenes faecalis*. Поскольку все эти последовательности запатентованы, для клонирования был выбран другой штамм *Alcaligenes faecalis* VKM B-1518 (DSM) из Всероссийской коллекции микроорганизмов (г. Пушкино).

Конструирование праймеров проводили используя выравнивание известных нуклеотидных последовательностей AfПА, а именно 5'-конец гена был принят за основу для прямого праймера, комплементарной матричной цепи ДНК, и 3'-конец гена для обратного праймера, который комплементарен кодирующей цепи ДНК. Фланкирующие праймеры дополнительно содержали последовательности некоторых рестриктаз, необходимых при клонировании в экспрессионный вектор: *NdeI* в прямом праймере AFPA_F и *HindIII/EcoRI* в обратном AFPA_R. В итоге были синтезированы праймеры со следующей нуклеотидной последовательностью:

AFPA_F 5' -aaataagggacac**catatg**cagaaagggcttgt-3'

AFPA_R 5' -tgcc**gaattc**aaagcttaaggctgaggctgaatcaacag-3'.

Клонирование гена AfПА осуществляли методом ПЦР. При этом в качестве матрицы выступала геномная ДНК штамма *A.faecalis* VKM B-1518 (DSM). Для получения продукта с высоким выходом потребовалась оптимизация условий проведения ПЦР. В результате были найдены следующие оптимальные параметры: температура отжига 58°C, продолжительность отжига и элонгации 2 мин. Итоговый ПЦР-продукт длиной приблизительно 2550 п.н. был очищен методом электрофореза в 1% агарозном геле, обработан рестриктазами *NdeI/HindIII* и клонирован по данным сайтам рестрикции в экспрессионный вектор на основе плазмиды pBR322. После трансформации клеток *E.coli* TG1 лигазной смесью было отобрано восемь колоний. Для каждого клона была выделена и секвенирована плазмида [186].

4.1.2. Секвенирование плазмид и сравнительный анализ полученных последовательностей

Секвенирование показало, что два клона имеют одинаковую нуклеотидную последовательность, которая была принята за фермент дикого типа. Остальные шесть клонов содержали нуклеотидные замены. Выравнивание аминокислотных последовательностей показано на рис. 4.1. Мутации были локализованы в сигнальной последовательности (G10V), в участках гена, кодирующих две субъединицы, а также в спейсере. Список соответствующих аминокислотных замен представлен в таблице 4.1. На рис. 4.2 изображено пространственное расположение

аминокислотных замен в трехмерной структуре АфПА. Мутации расположены как на поверхности (β Q133R (M2); α N183S, β E439G (M6)), так и внутри молекулы фермента (β K184E (M2); α M43L, β Y137H (M3), β Y90H (M4); α D132G, β R97C (M5); α V5E (M6)), в том числе у основания конуса активного центра (β Q133R (M2), β Y137H (M3)).

Таблица 4.1.

Мутантная форма АфПА	Аминокислотные замены
M1	sV2A*, β Q12stop*
M2	β Q133R, β K184E
M3	α M43L, β Y137H
M4	β Y90H
M5	α D132G, β R97C
M6	α V5E, α N183S, β E439G

*s – спейсер, stop – стоп-кодон (tag), α – α -субъединица, β – β -субъединица

Причина появления мутаций при клонировании гена АфПА с геномной ДНК бактерии *A.faecalis* заключается в ошибках при амплификации гена во время ПЦР. Это связано с высоким GC-составом гена АфПА (57%) и с относительно большой длиной гена (2451 п.н.), что повышает вероятность встраивания некоплементарного нуклеотида при ПЦР. Образование мутаций при амплификации гена АфПА методом ПЦР с геномной ДНК бактерии *Alcaligenes faecalis* VKM B-1518 (DSM) не связано с условиями реакции ПЦР, температурой отжига и продолжительностью цикла, так как предварительно была выполнена оптимизация условий реакции ПЦР.

Сравнение аминокислотной последовательности фермента АфПА VKM B-1518 (DSM) с тремя другими известными ферментами ПА из *Alcaligenes faecalis* показало, что АфПА VKM B-1518 (DSM) имеет восемь уникальных аминокислотных замен, а степень идентичности нуклеотидной последовательности по сравнению с указанными ферментами составляет 91-94%.

1	11	21	31	41	51	61	71	81	91	101
VKM	MQKGLVRTGGAAGLILGLAWAPAHAQVQSVFVMDRDSYGVPHVFADSHYGLYGYGYVAQDRLLFQMDMARRSFVGTAAVLGPGDQDVYVKYDMQVRRQN									
M1	MQKGLVRTGMAAAGLILGLAWAPAHAQVQSVFVMDRDSYGVPHVFADSHYGLYGYGYVAQDRLLFQMDMARRSFVGTAAVLGPGDQDVYVKYDMQVRRQN									
M2	MQKGLVRTGMAAAGLILGLAWAPAHAQVQSVFVMDRDSYGVPHVFADSHYGLYGYGYVAQDRLLFQMDMARRSFVGTAAVLGPGDQDVYVKYDMQVRRQN									
M3	MQKGLVRTGMAAAGLILGLAWAPAHAQVQSVFVMDRDSYGVPHVFADSHYGLYGYGYVAQDRLLFQMDMARRSFVGTAAVLGPGDQDVYVKYDMQVRRQN									
M4	MQKGLVRTGMAAAGLILGLAWAPAHAQVQSVFVMDRDSYGVPHVFADSHYGLYGYGYVAQDRLLFQMDMARRSFVGTAAVLGPGDQDVYVKYDMQVRRQN									
M5	MQKGLVRTGMAAAGLILGLAWAPAHAQVQSVFVMDRDSYGVPHVFADSHYGLYGYGYVAQDRLLFQMDMARRSFVGTAAVLGPGDQDVYVKYDMQVRRQN									
M6	MQKGLVRTGMAAAGLILGLAWAPAHAQVQSVFVMDRDSYGVPHVFADSHYGLYGYGYVAQDRLLFQMDMARRSFVGTAAVLGPGDQDVYVKYDMQVRRQN									
101	111	121	131	141	151	161	171	181	191	201
VKM	FTPASIQRQIAALS KDERDIFRQYADGYNAYLEQVRRRPELLPKKEYVDFDQPEPLTDFDVVMIWVGS MANRFS DTNLEVTALAMRQSLEKQHGPERGRA									
M1	FTPASIQRQIAALS KDERDIFRQYADGYNAYLEQVRRRPELLPKKEYVDFDQPEPLTDFDVVMIWVGS MANRFS DTNLEVTALAMRQSLEKQHGPERGRA									
M2	FTPASIQRQIAALS KDERDIFRQYADGYNAYLEQVRRRPELLPKKEYVDFDQPEPLTDFDVVMIWVGS MANRFS DTNLEVTALAMRQSLEKQHGPERGRA									
M3	FTPASIQRQIAALS KDERDIFRQYADGYNAYLEQVRRRPELLPKKEYVDFDQPEPLTDFDVVMIWVGS MANRFS DTNLEVTALAMRQSLEKQHGPERGRA									
M4	FTPASIQRQIAALS KDERDIFRQYADGYNAYLEQVRRRPELLPKKEYVDFDQPEPLTDFDVVMIWVGS MANRFS DTNLEVTALAMRQSLEKQHGPERGRA									
M5	FTPASIQRQIAALS KDERDIFRQYADGYNAYLEQVRRRPELLPKKEYVDFDQPEPLTDFDVVMIWVGS MANRFS DTNLEVTALAMRQSLEKQHGPERGRA									
M6	FTPASIQRQIAALS KDERDIFRQYADGYNAYLEQVRRRPELLPKKEYVDFDQPEPLTDFDVVMIWVGS MANRFS DTNLEVTALAMRQSLEKQHGPERGRA									
201	211	221	231	241	251	261	271	281	291	301
VKM	LFDELLWINDTTAPTTPAPAAEHKPOARAGTQNLAHVSSQVLAAELELERQDKHWGGRGPDFAPKASNLWSTRPERVQDGGSTVLLINGPQFGWYNPXYTYGI									
M1	LFDELLWINDTTAPTTPAPAAEHKPOARAGTQNLAHVSSQVLAAELELERQDKHWGGRGPDFAPKASNLWSTRPERVQDGGSTVLLINGPQFGWYNPXYTYGI									
M2	LFDELLWINDTTAPTTPAPAAEHKPOARAGTQNLAHVSSQVLAAELELERQDKHWGGRGPDFAPKASNLWSTRPERVQDGGSTVLLINGPQFGWYNPXYTYGI									
M3	LFDELLWINDTTAPTTPAPAAEHKPOARAGTQNLAHVSSQVLAAELELERQDKHWGGRGPDFAPKASNLWSTRPERVQDGGSTVLLINGPQFGWYNPXYTYGI									
M4	LFDELLWINDTTAPTTPAPAAEHKPOARAGTQNLAHVSSQVLAAELELERQDKHWGGRGPDFAPKASNLWSTRPERVQDGGSTVLLINGPQFGWYNPXYTYGI									
M5	LFDELLWINDTTAPTTPAPAAEHKPOARAGTQNLAHVSSQVLAAELELERQDKHWGGRGPDFAPKASNLWSTRPERVQDGGSTVLLINGPQFGWYNPXYTYGI									
M6	LFDELLWINDTTAPTTPAPAAEHKPOARAGTQNLAHVSSQVLAAELELERQDKHWGGRGPDFAPKASNLWSTRPERVQDGGSTVLLINGPQFGWYNPXYTYGI									
301	311	321	331	341	351	361	371	381	391	401
VKM	GLHGAGFDVVGNTTFFAYPIVILFQTNSEIAWGATAGPQDVVDMYQEKLNPARADQYWFNNAWRIMEQRKERIQVRGQADREMTIWRITVHGPVMQFDYEQGA									
M1	GLHGAGFDVVGNTTFFAYPIVILFQTNSEIAWGATAGPQDVVDMYQEKLNPARADQYWFNNAWRIMEQRKERIQVRGQADREMTIWRITVHGPVMQFDYEQGA									
M2	GLHGAGFDVVGNTTFFAYPIVILFQTNSEIAWGATAGPQDVVDMYQEKLNPARADQYWFNNAWRIMEQRKERIQVRGQADREMTIWRITVHGPVMQFDYEQGA									
M3	GLHGAGFDVVGNTTFFAYPIVILFQTNSEIAWGATAGPQDVVDMYQEKLNPARADQYWFNNAWRIMEQRKERIQVRGQADREMTIWRITVHGPVMQFDYEQGA									
M4	GLHGAGFDVVGNTTFFAYPIVILFQTNSEIAWGATAGPQDVVDMYQEKLNPARADQYWFNNAWRIMEQRKERIQVRGQADREMTIWRITVHGPVMQFDYEQGA									
M5	GLHGAGFDVVGNTTFFAYPIVILFQTNSEIAWGATAGPQDVVDMYQEKLNPARADQYWFNNAWRIMEQRKERIQVRGQADREMTIWRITVHGPVMQFDYEQGA									
M6	GLHGAGFDVVGNTTFFAYPIVILFQTNSEIAWGATAGPQDVVDMYQEKLNPARADQYWFNNAWRIMEQRKERIQVRGQADREMTIWRITVHGPVMQFDYEQGA									

Рис. 4.1. Сравнение аминокислотных последовательностей вариантов рекомбинантной AfPA (M1-M6), полученных при клонировании гена пенициллинацилазы из штамма *Alcaligenes faecalis* VKM B-1518 (DSM).

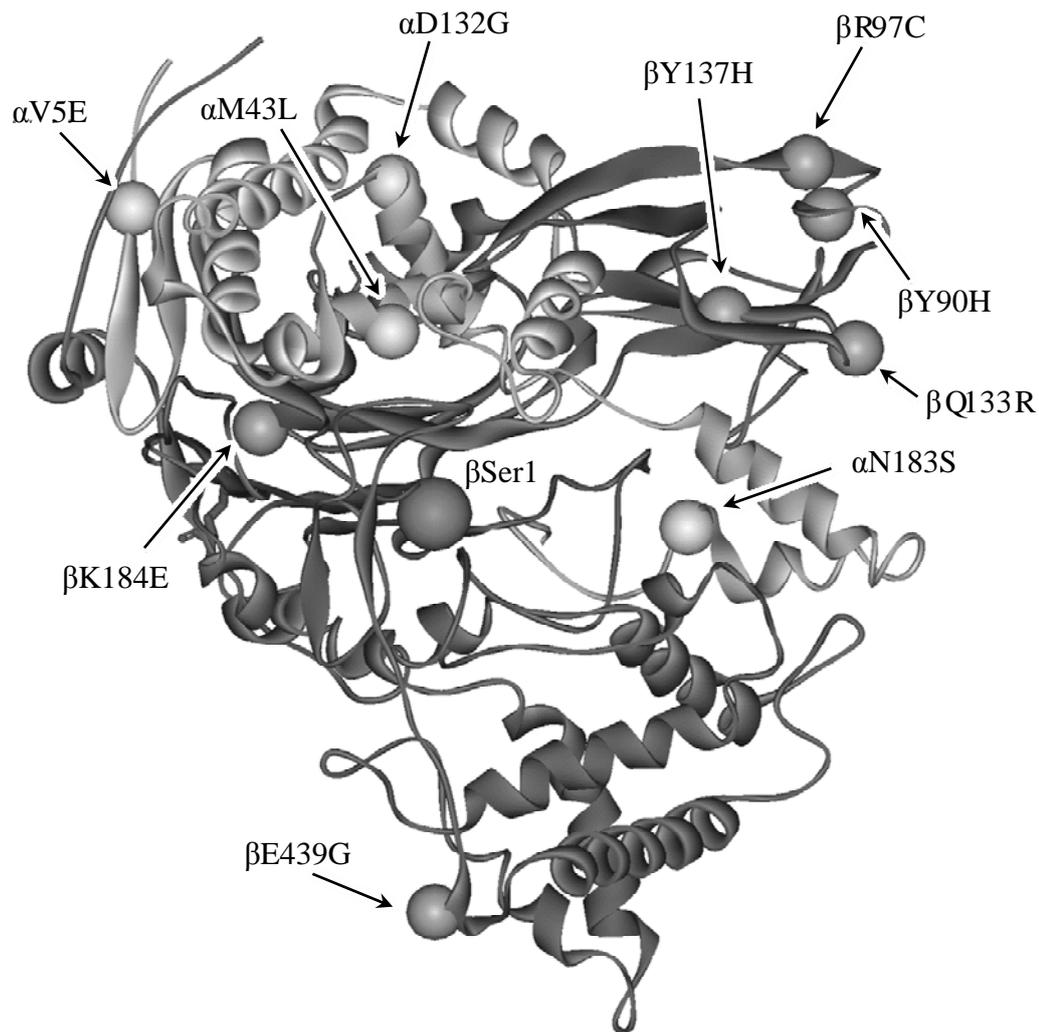


Рис. 4.2. Пространственное расположение аминокислотных замен в трехмерной структуре AfПА. Каталитический остаток β Ser1 расположен в центре и указан сферой большего размера.

4.1.3. Экспрессия мутантных форм рекомбинантной AfПА в *E.coli*

Культивирование рекомбинантного штамма-продуцента *E.coli* TG1 с плазмидами мутантных AfПА проводили при температуре 15°C в течение 65 часов, как описано выше (п. 3.2.5) (рис. 4.3). В процессе культивирования производился отбор проб и выделение периплазматической фракции. Полученные образцы анализировали на наличие пенициллинацилазной активности с использованием субстрата NIPAB (п. 3.2.8) (табл. 4.2), а уровень экспрессии мутантных форм относительно общего белка периплазмы определяли методом электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях (п. 3.2.14) (рис. 4.4).

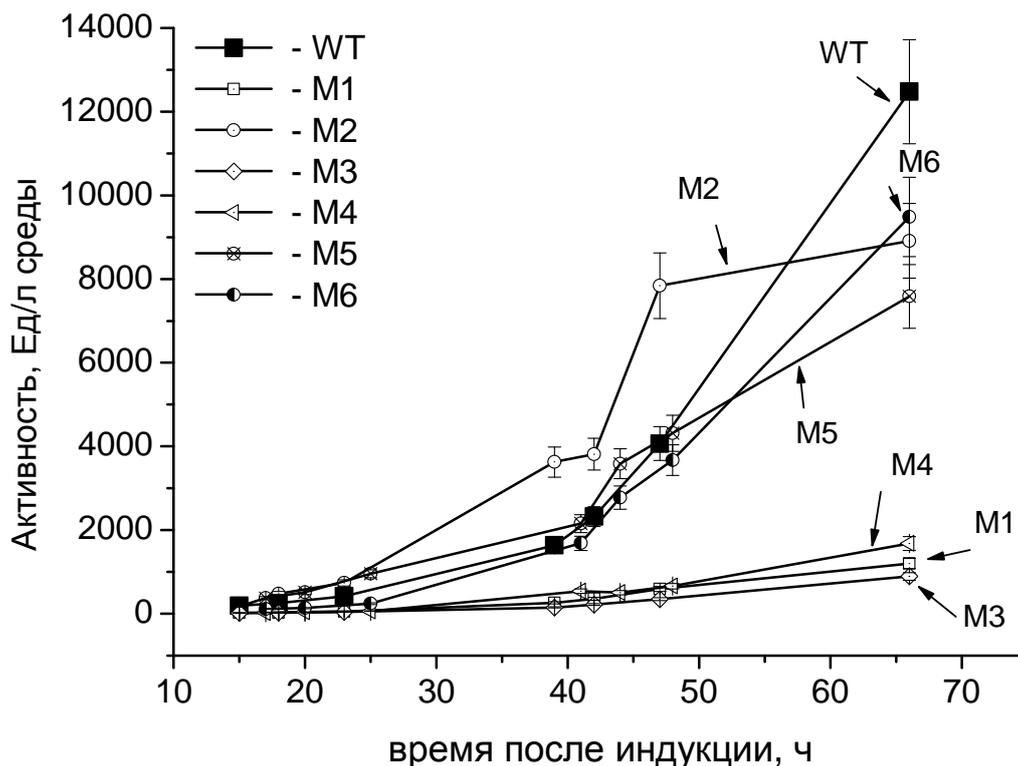


Рис. 4.3. Экспрессия wtAfPA дикого типа и клонов AfPA M1-6 в *E. coli* TG1 (15°C).

На рис. 4.3. показан профиль активности в периплазматическом экстракте в пробах, отбираемых в процессе культивирования.

Таблица 4.2.

Экспрессия AfPA дикого типа и ее мутантов в клетках *E. coli* TG1 (15°C, 65 ч).

Фермент AfPA	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

В таблице 4.2 сведены параметры, характеризующие культивирование полученных рекомбинантных штаммов: выход биомассы, объемная и удельная

активность в периплазматическом экстракте и культуральной жидкости. На рис. 4.4 показаны электрофореграммы препаратов ферментов wt AfПА и AfПА М1-6 по окончании культивирования. На электрофореграмме отчетливо видны две полосы, соответствующие α - и β -субъединице фермента (23,8 и 62,7 кДа соответственно). Хорошо видно, что уровень экспрессии заметно отличается для разных мутантных форм: самый высокий уровень экспрессии наблюдался для wt-AfПА и клонов М2, М4, М5 и М6. Полученные результаты свидетельствуют о влиянии аминокислотных замен в гене фермента на уровень биосинтеза 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.

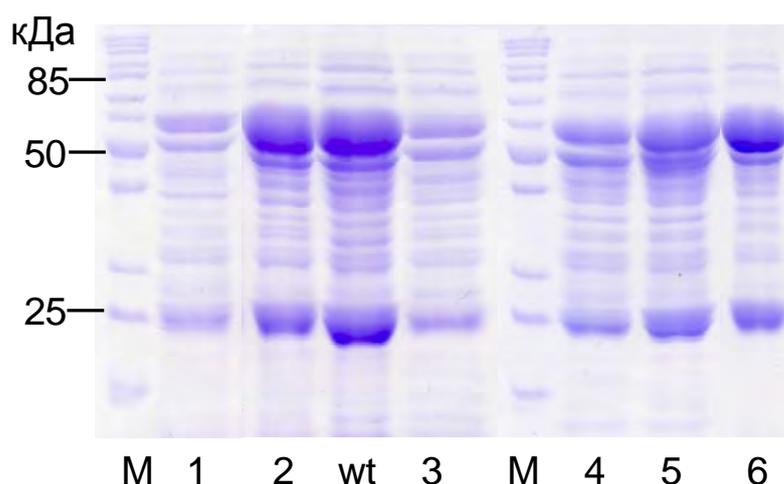


Рис. 4.4. Аналитический SDS-ПААГ электрофорез образцов мутантных AfПА (М1–М6) и фермента дикого типа (wt) после культивирования; М – маркер молекулярной массы.

В случае мутантной формы М1 нуклеотидная замена привела к образованию стоп-кодона tag ("Янтарь") в начале β -субъединицы. При этом мутант М1 проявлял пенициллинацилазную активность, однако выход по активности и уровень биосинтеза были низкими. Согласно аналитическому электрофорезу, β -субъединица экспрессируется в полном размере. Таким образом, стоп-кодон tag не всегда приводит к остановке биосинтеза полипептидной цепи.

Как видно из таблицы 4.2, наибольший выход по активности в периплазматическом экстракте наблюдался для мутантных форм AfПА М2, М4, М5, М6. Самая высокая активность в культуральной жидкости наблюдалась для мутанта AfПА М1 и составила 19% общей активности, по сравнению с 2-8% для остальных мутантов. Наличие активности в среде может быть связано с лизисом клеток.

Для характеристики свойств были выбраны мутантные формы М2, М4, М5 и М6 как имеющие наибольший выход по активности (табл. 4.2).

4.1.4. Выделение и очистка фермента дикого типа и его мутантов

Из клеток *E.coli* фермент дикого типа и мутантные формы выделяли осмотическим шоком, и белки периплазматического экстракта осаждали насыщенным раствором сульфата аммония (до 2,9 М). Для исследования свойств мутантных ферментов были использованы неочищенные препараты, полученные обессоливанием периплазматического экстракта гель-фильтрацией на колонке с носителем Sephadex G25.

4.1.5. Изучение каталитических свойств фермента дикого типа и его мутантов

Кинетические параметры V_{\max} и K_m были рассчитаны методом нелинейной регрессии из графика зависимости начальной скорости реакции гидролиза NIPAB от концентрации субстрата. Для расчета величины каталитической константы определяли концентрацию активных центров фермента титрованием необратимым ингибитором фенилметилсульфонилфторидом (PMSF). График зависимости начальной скорости гидролиза субстрата от концентрации NIPAB для фермента дикого типа приведен на рис. 4.5. Значения k_{cat} и K_m приведены в таблице 4.3.

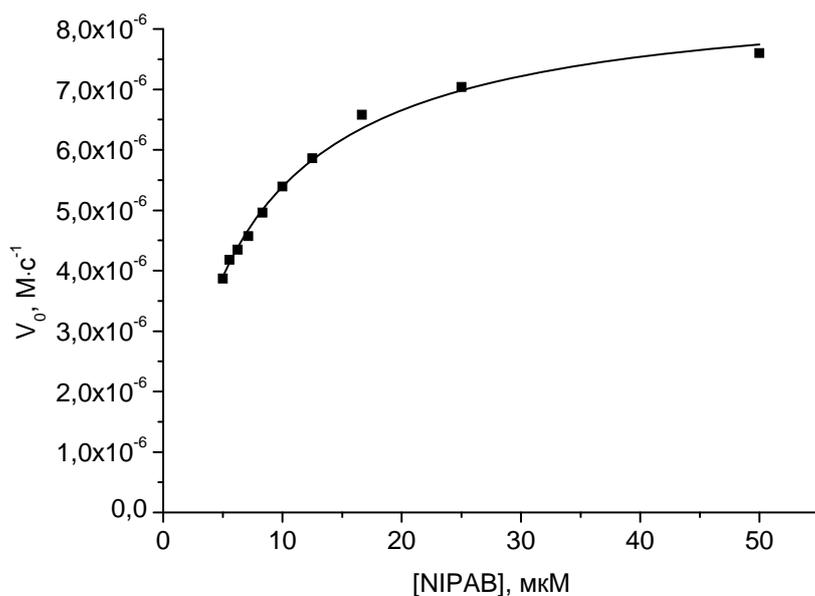


Рис. 4.5. Зависимость начальной скорости реакции гидролиза субстрата NIPAB от концентрации субстрата для wt-AfПА.

Таблица 4.3.

Значения каталитических параметров и констант скорости инактивации AfПА

Фермент AfПА	k_{cat} , c^{-1}	K_m , мкМ	k_{cat}/K_m , $мкМ^{-1} \cdot c^{-1}$	k_{in} , $10^{-4} c^{-1}$
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

Мутация β Q133R 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 β K184E реализуется замена положительно заряженного остатка (Lys) на отрицательно заряженный (Glu), локализованный в β -листе внутри глобулы. Вероятно, соответствующие замены аминокислотных остатков β Q133 и β K184 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.

4.1.6. Сравнительное изучение термостабильности мутантных AfПА

Для выбранных ферментов wt-AfПА и AfПА М4, М5, М6 была изучена кинетика термоинактивации при температуре 54°C 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, как видно из рис. 4.6. 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. 4.3) для изученных ферментов показало, что наибольшей термостабильностью обладают фермента дикого типа и мутант AfПА М2, а мутантные формы AfПА М4, М5, М6 проявляют более низкую термостабильность, чем фермент дикого типа.

В случае AfПА М4 аминокислотная замена βY90H локализована в составе β листа, внутри глобулы. Вероятно, замена неполярной аминокислоты (Tyr) на положительно заряженный остаток (His) внутри белковой глобулы приводит к дестабилизации молекулы фермента и, как следствие, пониженной термостабильности. Замена βE439G в случае мутантной формы AfПА М6 приводит к появлению остатка глицина вместо отрицательно заряженного остатка Glu, что может повлиять на стабильность молекулы в водном растворе, поскольку при этом полярность поверхности белковой глобулы понижается.

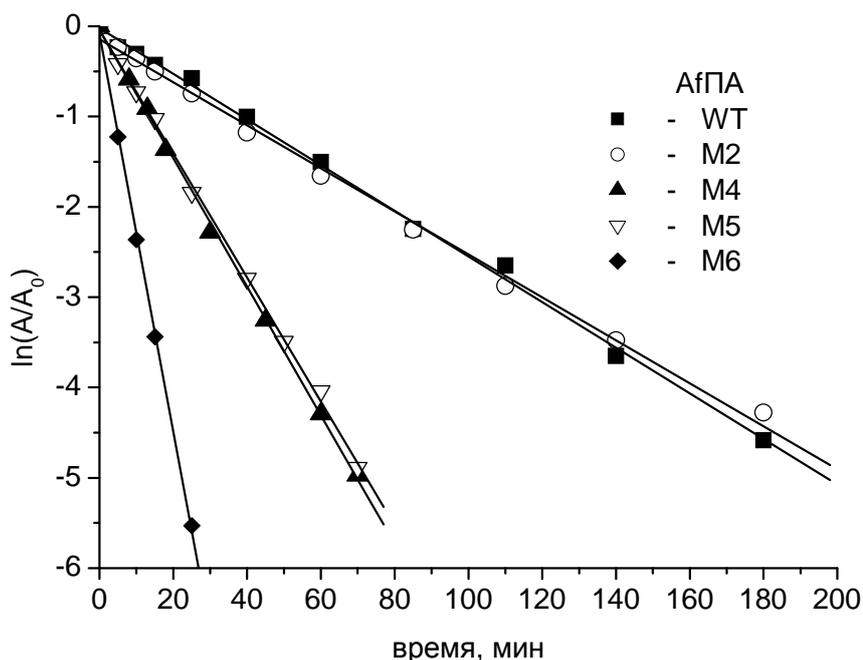


Рис. 4.6. Кинетика термоинактивации в полулогарифмических координатах для фермента дикого типа (WT) и четырех мутантных форм M2, M4, M5 и M6 (54°C; 0,01 М КН₂РО₄, 0,1 М КСl; рН 8,0).

В случае AfПА M4 аминокислотная замена βУ90Н локализована в составе β листа, внутри глобулы. Вероятно, замена неполярной аминокислоты (Tyr) на положительно заряженный остаток (His) внутри белковой глобулы приводит к дестабилизации молекулы фермента и, как следствие, пониженной термостабильности. Замена βE439G в случае мутантной формы AfПА M6 приводит к появлению остатка глицина вместо отрицательно заряженного остатка Glu, что может повлиять на стабильность молекулы в водном растворе, поскольку при этом полярность поверхности белковой глобулы понижается.

Несмотря на различия в K_m и k_{cat} , каталитическая эффективность у мутантных форм M2, M4, M5 и M6 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.

4.1.7. Изучение термостабильности фермента дикого типа

Более подробно была изучена температурная стабильность AfПА дикого типа измерением кинетики термоинактивации при разных условиях (температура инактивации, рН и концентрация буферного раствора) и методом ДСК. Для последующей работы использовали гомогенный препарат фермента дикого типа, очищенный методами гидрофобной и ионообменной хроматографии.

4.1.7.1. Кинетика термоинактивации при разных температурах

Кинетику термоинактивации фермента дикого типа wt-AfПА изучали в 0,1 М калий-фосфатном буферном растворе в диапазоне температур 51-59°C. Из графика зависимости остаточной активности от времени (рис. 4.7) следует, что кривые термоинактивации линейаризуются в полулогарифмических координатах, что соответствует кинетике реакции первого порядка.

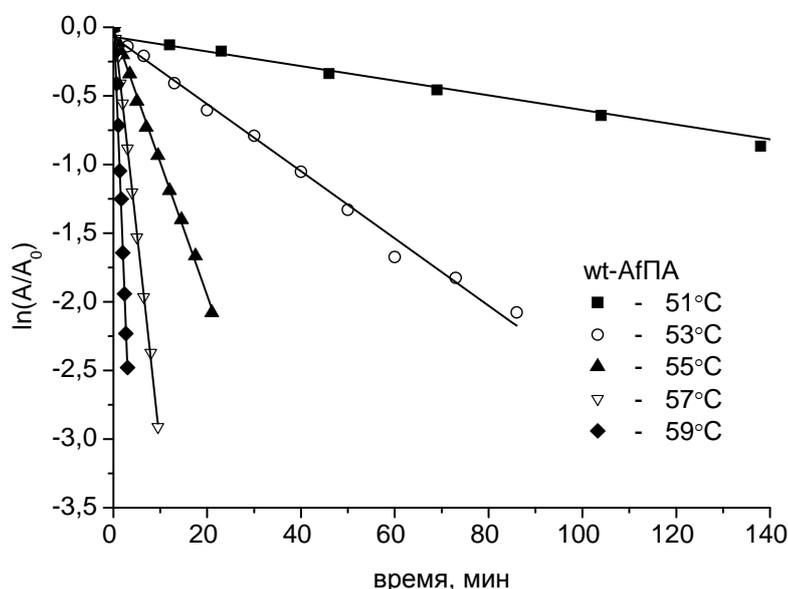


Рис. 4.7. Кинетика термоинактивации wt-AfПА при разных температурах (0,1 М KH_2PO_4 , рН 8,0).

Термостабильность фермента дикого типа wt-AfПА зависит от состава буферного раствора, что демонстрирует рис. 4.8.

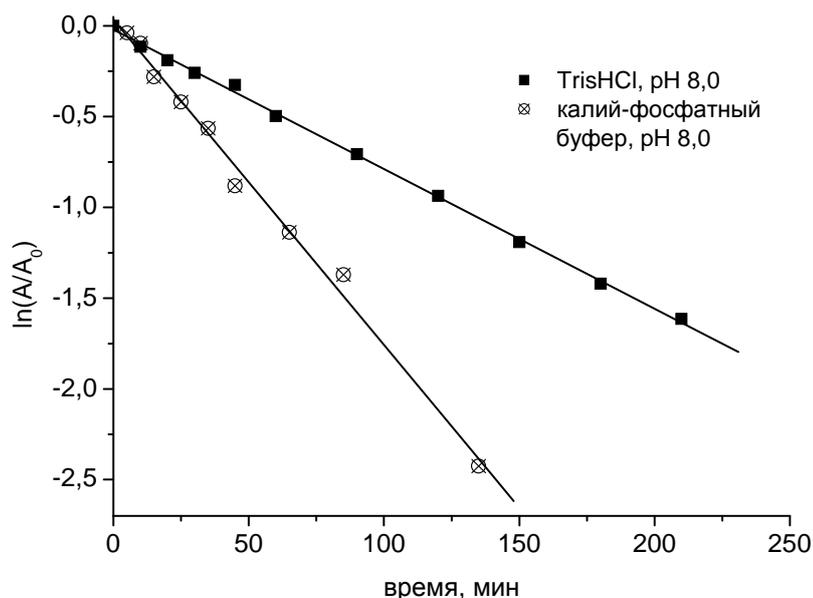


Рис. 4.8. Кинетика термоинактивации wt-AfПА в 0,1 М Tris-буфере (рН 8,0) и калий-фосфатном буфере (0,01 М K_2HPO_4 ; 0,1 М KCl , рН 8,0) при 52°C.

Тангенс угла наклона прямых, полученных при измерении кинетики термоинактивации wt-AfПА, отличается более чем в два раза и равен величине константы скорости инактивации фермента k_{in} . Таким образом, термостабильность фермента дикого типа в Tris-буферном растворе выше по сравнению с калий-фосфатным буферным раствором.

4.1.7.2. рН-зависимость константы скорости инактивации

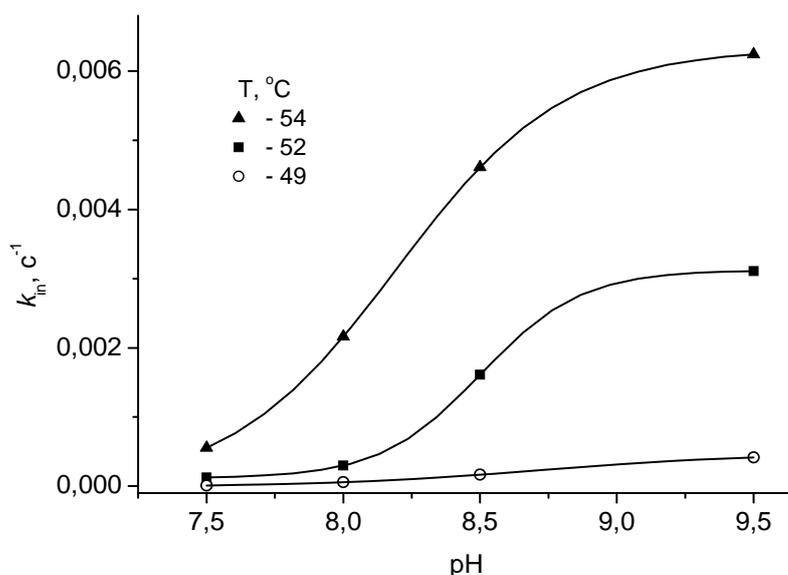


Рис. 4.9. рН-зависимость константы скорости инактивации для wt-AfПА (0,1 М TrisHCl).

Зависимость константы скорости инактивации фермента дикого типа от pH описывается сигмоидальной функцией (рис. 4.9). На графике изображены такие зависимости $k_{in}(pH)$ для трех температур инактивации. Из наблюдаемых величин k_{in} следует, что термостабильность wt-AfПА снижается с увеличением температуры и pH. Точка перегиба функций (рис. 4.9) соответствует значению pH 8,4-8,5. Это означает, что в результате ионизации какого-то аминокислотного остатка фермент претерпевает конформационный переход, и температурная стабильность понижается. Наиболее близкое значение константы кислотности pK_a к значению pH точки перегиба имеет аминокислота остатка лизина, $pK_a(Lys) \sim 8,5-9,0$.

4.1.7.3. Зависимость стабильности wt-AfПА от ионной силы при трех pH

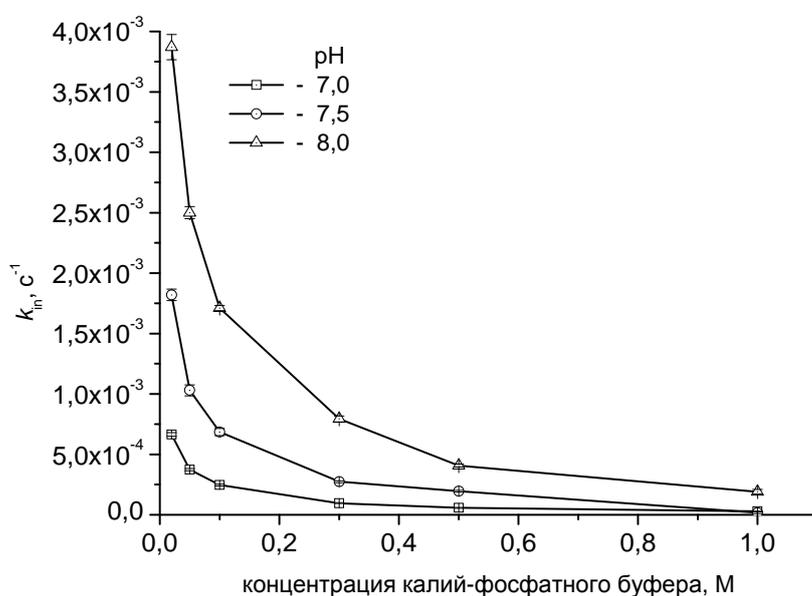


Рис. 4.10. Зависимость константы скорости инактивации от pH и концентрации калий-фосфатного буферного раствора для wt-AfПА (56°C).

В рамках исследования температурной стабильности AfПА дикого типа была изучена кинетика термоинактивации wt-AfПА в зависимости от концентрации и pH буферного раствора при температуре 56°C (рис. 4.10). В результате были определены следующие закономерности термостабильности wt-AfПА: величина константы скорости инактивации возрастает (соответственно, термостабильность понижается) с увеличением pH буфера и с понижением концентрации буферного раствора.

4.1.7.4. Изучение термостабильности AfPA дикого типа с помощью ДСК

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

Для ДСК было проведено отдельное культивирование и очистка фермента методами 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 представляет один четкий пик, молекула фермента не содержит дополнительных калориметрических доменов.

На рис. 4.11 и 4.12 представлены графики температурной зависимости парциальной удельной теплоемкости $C_p(T)$ при разных условиях.

Площадь пика на экспериментальной кривой ДСК пропорциональна изменению калориметрической энтальпии ΔH реакции термоденатурации белка, а максимум кривой соответствует температуре фазового перехода T_{max} (табл. 4.4).

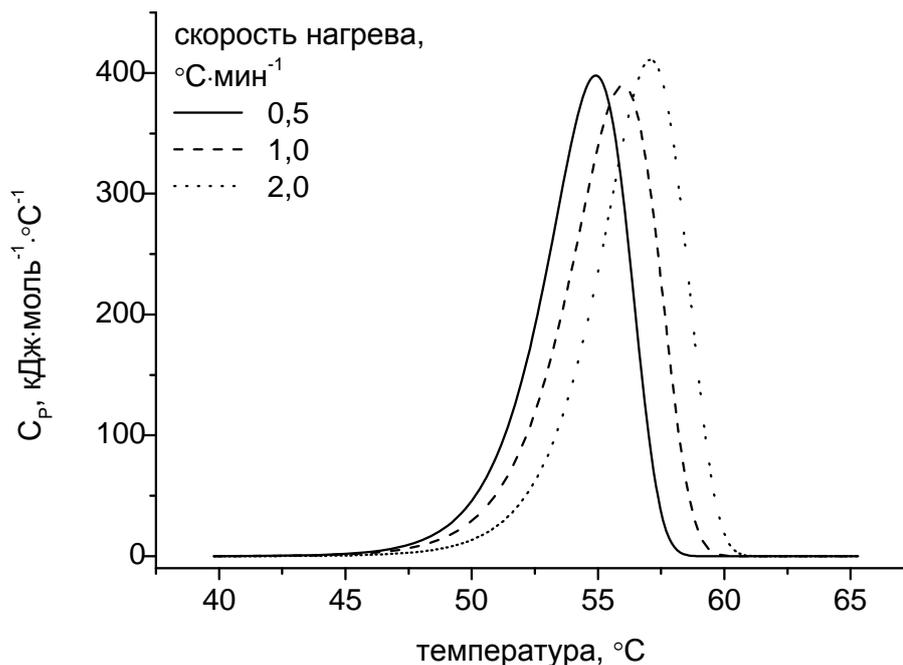


Рис. 4.11. Кривые ДСК wt-AfPA, полученные при разной скорости нагрева (при концентрации фермента 3 мг·мл⁻¹; 0,1 М калий-фосфатный буфер, pH 8,0).

Теплоемкость раствора белка больше, чем теплоемкость буферного раствора, так как молекула белка обладает большим количеством степеней свободы за счет колебательного, вращательного и поступательного движения. Соответственно раствор белка будет нагреваться медленнее, чем буферный раствор в ячейке сравнения. Термопара измеряет разность температур двух ячеек калориметра. Для того чтобы разность температур была нулевой, к ячейке с раствором белка подается дополнительная мощность, и в результате измеряется разность мощностей ΔW . До и после денатурации теплоемкость белка постоянна. В момент денатурации на графике изменения теплоемкости как функции времени появляется пик, который имеет максимум – максимальную температуру T_{\max} фазового перехода. Учитывая, что температура есть мера средней кинетической энергии молекул, характерный вид кривой ДСК связан с распределением молекул белка по скоростям.

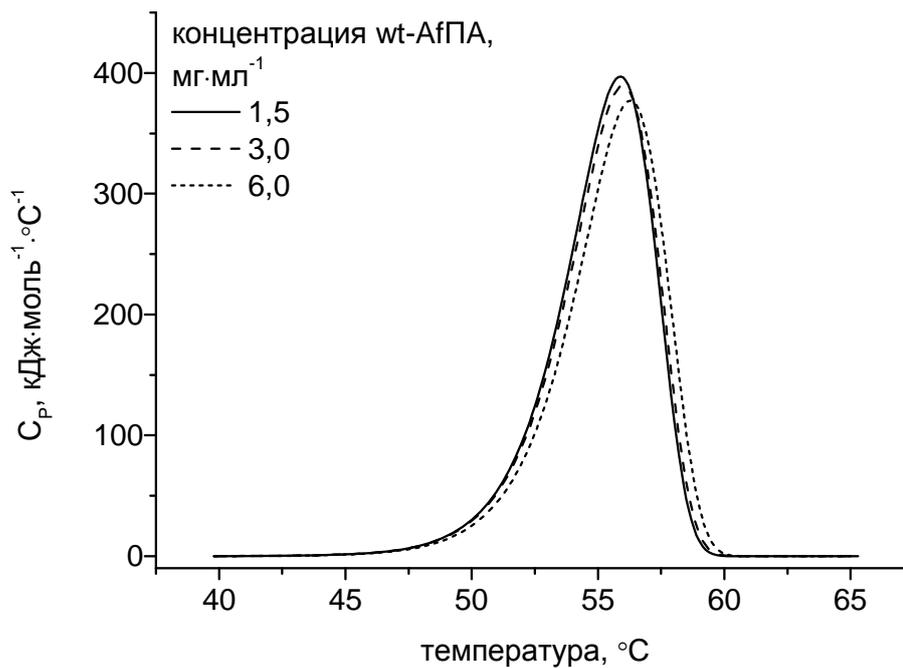


Рис. 4.12. Кривые ДСК wt-AfPA при разных концентрациях фермента (скорость сканирования $1\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{мин}^{-1}$; $0,1\text{ М}$ калий-фосфатный буфер, pH 8,0).

Экспериментальные кривые ДСК представляют результат измерения разности теплового потока через измерительные ячейки с образцом и эталоном при программируемом изменении температуры нагревателя в изобарных условиях. В калориметре измеряется тепловая мощность, которую следует подать в одну из ячеек калориметра, чтобы обеспечить нулевую разность температур между ячейками.

Таблица 4.4.

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

Зависимость кривых плавления от концентрации AfПА			
концентрация wt-AfПА, мг·мл ⁻¹	1,5	3,0	6,0
скорость нагрева, °С·мин ⁻¹	1,016	1,015	1,01
ΔН*, 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	3,0	3,0	3,0
скорость нагрева, °С·мин ⁻¹	0,509	1,015	1,841
ΔН, Дж·моль ⁻¹	1717	1800	1820
T _{max} , °С	54,9	56	57,1

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

Метод ДСК характеризует структурную термостабильность фермента и служит дополнением к изучению функциональной термостабильности методом измерения кинетики термоинактивации фермента.

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 В-1518 (DSM), а также проведена характеристика свойств мутантных форм AfПА М2, М4, М5 и М6. 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 влияют на свойства фермента. Появление заряженных остатков внутри белковой глобулы и увеличение гидрофобности поверхности молекулы белка приводят к дестабилизации молекулы фермента и пониженной термостабильности.

4.2. Одноцепочечная пенициллинацилаза из *A. faecalis*

4.2.1. Компьютерное моделирование структуры вариантов одноцепочечной формы AfПА

Компьютерное моделирование структуры одноцепочечной sc-AfПА проводили на основе модельной структуры AfПА VKM В-1518 (DSM) (wt-AfПА). Модельная структура фермента дикого типа wt-AfПА была построена методом гомологичного моделирования согласно выравниванию по известной рентгеновской структуре ПА из *E. coli* (PDB 1E3A). На момент проведения моделирования рентгеновская структура ПА из *A. faecalis* была еще неизвестна и опубликована позже с низким разрешением 3,31 Å. Наложение модельной структуры на опубликованную в 2009 г. рентгеновскую структуру ПА из *Alcaligenes faecalis* (PDB 3K3W) по C α -атомам (RMSD=2,77Å) свидетельствует, что отличия наблюдаются для петель и микродоменов на поверхности глобулы.

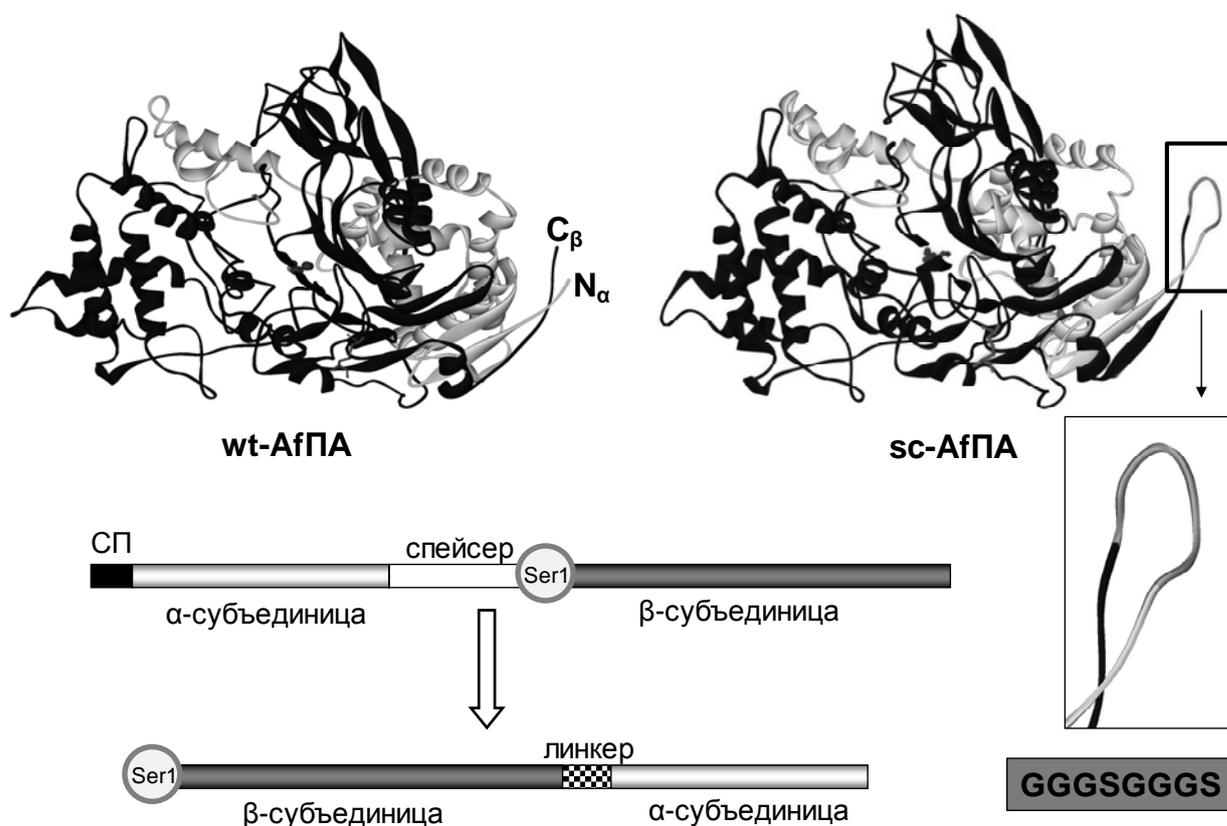


Рис. 4.13. Компьютерное моделирование линкера одноцепочечной (пермутированной) AfПА и схема генно-инженерной конструкции sc-AfПА. СП – сигнальный пептид, Ser1 – каталитический остаток βSer1 на N-конце β-субъединицы. N α – N-конец α-субъединицы, C β – C-конец β-субъединицы.

На рис. 4.13 показана трехмерная структура AfПА дикого типа и его одноцепочечной формы, а также схема получения генетической конструкции sc-AfПА.

Анализ трехмерной структуры AfПА дикого типа (wt-AfПА) показал, что N-конец α -субъединицы и C-конец β -субъединицы пространственно сближены и образуют β -лист, что позволяет соединить N- и C-концы коротким пептидом (рис. 4.13). В процессе компьютерного моделирования рассматривались различные варианты линкера, отличающиеся по аминокислотному составу и длине, и в результате были выбраны две наиболее перспективные сшивки. Отличия между ними заключались в отсутствии остатка Pro551 на C-конце β -субъединицы в случае одного варианта одноцепочечной AfПА (sc-AfПА2). Остаток Pro придает жесткость полипептидной цепи, уменьшая подвижность области соединительной петли, и соответственно может влиять на стабильность белка. 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. Длину линкера подбирали так, чтобы исключить конформационное напряжение в области N- и C-концов, и рассматривали варианты из 6, 7 и 8 аминокислотных остатков. Состав линкера был выбран на основе анализа литературных данных, согласно которым блок GGGGS используется для сшивки тяжелой и легкой цепей антител [97]. Похожие линкеры применялись для пермутации β -субъединицы эукариотического сигнального рецептора из *Saccharomyces cerevisiae* [89], щелочной фосфатазы из *E.coli* [85] и стрептавидина [81].

Ген фермента дикого типа кодирует неактивный полипептид-предшественник, который образуется в результате трансляции в цитоплазме бактерии *E.coli*. В результате посттрансляционной модификации, или процессинга, этот полипептид преобразуется в активный гетеродимер, локализованный уже в периплазме. Процессинг включает транспортировку полипептида-предшественника в периплазму с отщеплением сигнального пептида и

последовательное удаление спейсера (рис. 4.14). Таким образом, окончательный фолдинг и активация фермента происходят в периплазме.

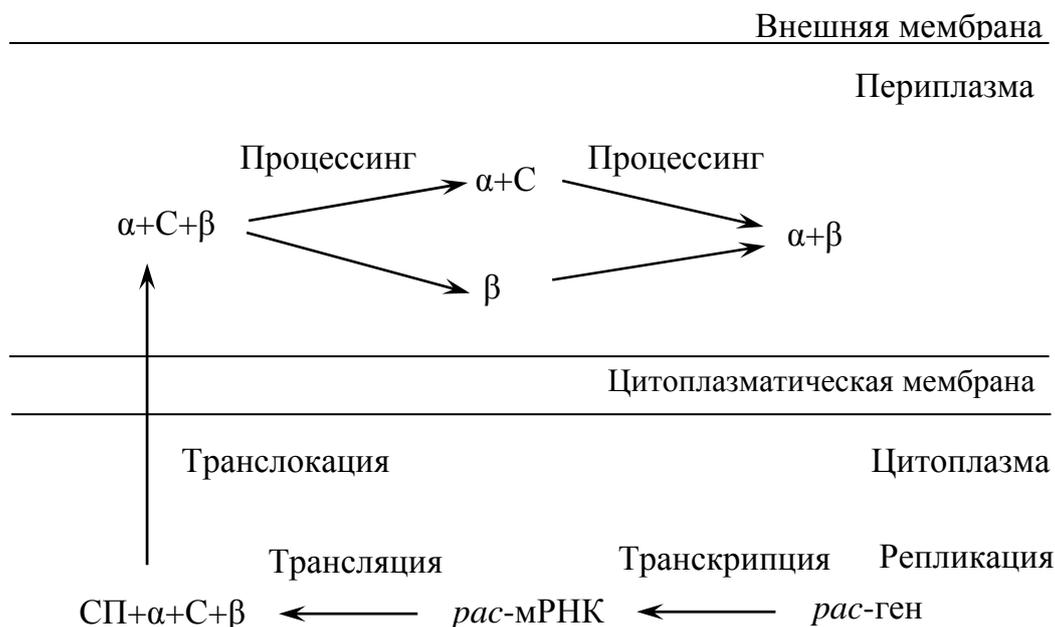


Рис. 4.14. Процессинг ПА дикого типа (рисунок из статьи [58]). СП – сигнальный пептид, С – спейсер.

Из первой части данной работы следует, что аминокислотные замены в ферменте дикого типа wt-AfПА существенно влияют на количество рекомбинантного белка в клетке *E.coli*. Это следует из электрофореза образцов после культивирования и величины выхода активного белка. Такая зависимость может быть связана с тем, что мутации приводят к образованию редких кодонов. Кроме того, аминокислотные замены могут изменять конформацию белка, а, следовательно, оказывать влияние на фолдинг и в частности быть причиной протеолиза в результате неправильного фолдинга или появления сайтов, узнаваемых внутриклеточными протеазами. Другая причина заключается в изменении скорости этапов процессинга – лимитирующей стадии. В данном случае на скорость транспортировки к периплазме способна влиять работа шаперонов Sec-системы. На перемещение полипептида уже без сигнальной последовательности через цитоплазматическую мембрану влияет множество факторов, в том числе наличие ионов кальция [61]. Если принять, что продукты экспрессии не деградируются протеазами, а весь белок после трансляции образует активную форму, то единственной причиной такой зависимости выхода активного белка от

введения нуклеотидных замен может быть неэффективная транскрипция либо трансляция.

4.2.2. Получение генов двух вариантов одноцепочечной AfPA.

Процедура получения гена одноцепочечной sc-AfPA включала проведение трех реакций ПЦР. Нуклеотидная последовательность праймеров приведена в таблице 4.5.

Таблица 4.5.

Праймеры для получения одноцепочечной sc-AfPA.

Название	Последовательность	Длина
AFfus_Nde_F	5' - gcaaggaaaaaacat atg agtaatctgtggagcactcg -3'	37
AFfus_Stop_R	5' - ctctagagcc aagctt aggccagattctgcgtcc -3'	34
ALFA_fusion1_F	5' - cagcctgggtggaggtagtggtggaggtagtcaggtgcagtcgc -3'	43
ALFA_fusion2_F	5' - cctcaggggtggggaagtgggtggggaagtgcaggtgcagtcgc -3'	43
BETA_fusion1_R	5' - cacctgactacctccaccactacctccaccaggctgaggctg -3'	42
BETA_fusion2_R	5' - cacctgacttccaccaccacttccaccaccctgaggctgaat -3'	42
AFPA_BglII_F	5' - cgtgcaggagatctgggagt -3'	20

Цифры 1 и 2 относятся к первому и второму вариантам одноцепочечной sc-AfPA соответственно. В качестве матрицы выступала плазида на основе pBR322 с геном фермента дикого типа. Первая реакция проводилась с участием праймеров ALFA_fusion1(2)_F и AFfus_Stop_R. Первый праймер вводил последовательность, кодирующую линкер, а второй – стоп-кодон. ПЦР-продукт содержал несколько участков, кодирующих конец β -субъединицы, линкер и α -субъединицу вместе со стоп-кодоном. Вторая реакция позволяла получить участок ДНК, кодирующий часть β -субъединицы начиная от сайта рестрикции *Bgl*III, линкер и начало α -субъединицы, и включала праймеры AFPA_BglII_F и BETA_fusion1(2)_R. В объединяющей реакции ПЦР участвовали продукты первых двух реакций и фланкирующие праймеры AFPA_BglII_F и AFfus_Stop_R. Итоговый ПЦР-продукт содержал ген одноцепочечной sc-AfPA, начиная от сайта рестрикции *Bgl*III, расположенного в середине β -субъединицы. Амплификацию ДНК проводили именно от сайта *Bgl*III, так как ген пенициллинацилазы достаточно длинный (2451 пара оснований), что может приводить к появлению ошибочных нуклеотидов в результате работы *Pfu* ДНК-полимеразы. Таким образом, участок гена sc-AfPA лигировали по сайтам рестрикции *Bgl*III/*Acc*I в вектор, полученный ранее в нашей

лаборатории Ясной А.С. для одноцепочечного варианта AfПА с линкером GGK [186].

4.2.3. Переклонирование sc-AfПА1, sc-AfПА2 и wt-AfПА в вектор pET24a(+) и создание новой системы экспрессии на основе штамма *E.coli* BL21(DE3) CodonPlus/pLysS

Так как культивирование одноцепочечных sc-AfПА1-2 в системе экспрессии на основе штамма *E.coli* TG1 обуславливала низкие выходы активного фермента (п. 4.2.5.1, табл. 4.7), было решено создать новую систему экспрессии на основе плазмиды pET24a(+) и штамма *E.coli* BL21(DE3) CodonPlus/pLysS. Предполагалось, что это позволит повысить выход белка за счет сильного T7 промотора и отсутствия внутриклеточных протеаз La и Omp. С целью сравнения экспрессии одноцепочечных ферментов с AfПА дикого типа было проведено переклонирование всех трех ферментов wt-AfПА, sc-AfПА1 и sc-AfПА2 в вектор pET24a(+).

Рестрикция исходной плазмиды по сайтам *NdeI/HindIII* приводила к двум фрагментам ДНК близкой массы, которые плохо разделялись в 1% агарозном геле. По этой причине переклонирование проводили в два этапа: сначала фрагмент *NdeI/AgeI*, затем фрагмент *AgeI/HindIII*. Секвенирование плазмид подтвердило отсутствие побочных мутаций в гене фермента.

4.2.4. Экспрессия гена фермента дикого типа в системе экспрессии pET24a(+) / *E.coli* BL21(DE3) CodonPlus/pLysS

Системы экспрессии на основе штаммов *E.coli* TG1 и BL21(DE3) CodonPlus/pLysS обеспечивали примерно одинаковое количество активного фермента wt-AfПА. Среди основных отличий можно выделить более высокую скорость роста клеток и больший процент активности в среде при культивировании штамма *E.coli* BL21(DE3) CodonPlus/pLysS (до 16% по сравнению с 1% для TG1). На рис. 4.15 и 4.16 показана экспрессия фермента дикого типа в *E.coli* BL21(DE3) CodonPlus/pLysS и *E.coli* TG1 соответственно, а именно кривая роста клеток и профиль активности в бесклеточном экстракте и в культуруальной жидкости.

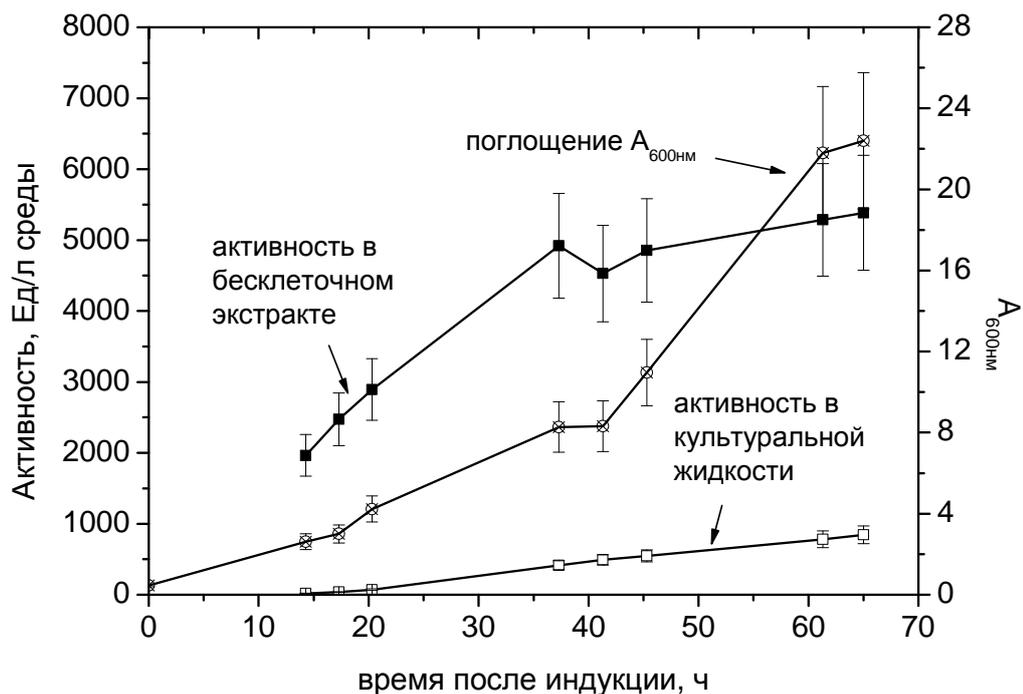


Рис. 4.15. Экспрессия фермента дикого типа wt-AfПА в клетках *E.coli* BL21(DE3) CodonPlus/pLysS (2YT, 15°C, 0,1 mM IPTG). Кривая роста как функция поглощения культуры клеток на 600 нм от времени (⊗) соответствует оси справа. Зависимости активности от времени культивирования в бесклеточном экстракте (■) и в среде (□) относятся к оси слева.

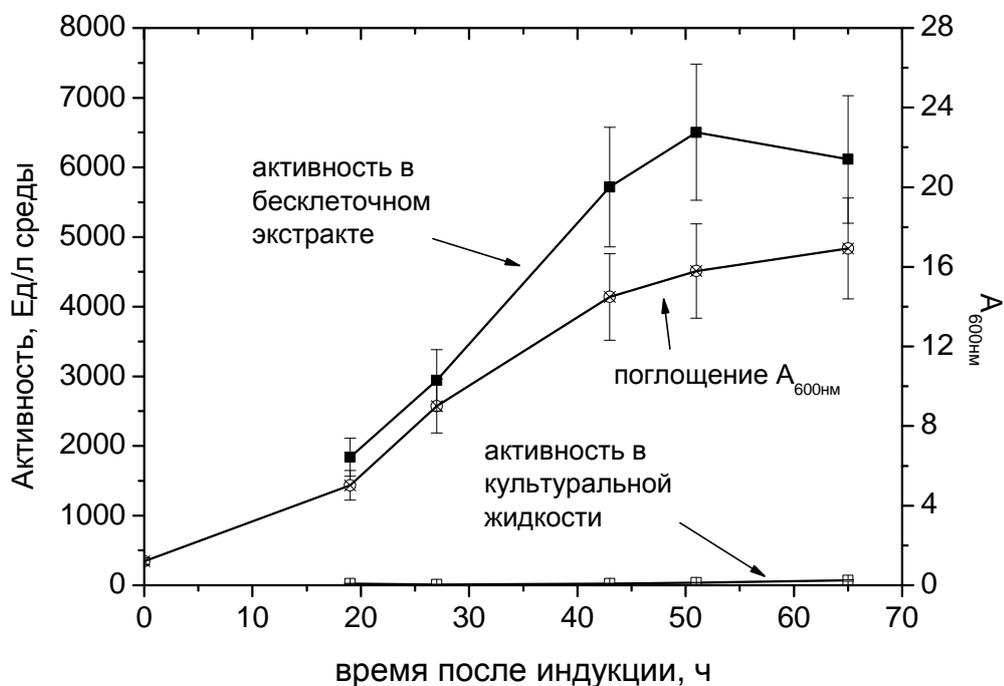


Рис. 4.16. Экспрессия фермента дикого типа wt-AfПА в клетках *E.coli* TG1 (2YT, 15°C, 0,1 mM IPTG). Кривая роста как функция поглощения культуры клеток на 600 нм от времени (⊗) соответствует оси справа. Зависимости активности от времени культивирования в бесклеточном экстракте (■) и в среде (□) относятся к оси слева.

4.2.5. Экспрессия гена sc-AfПА в системе экспрессии pET24a(+)/*E.coli* BL21(DE3) CodonPlus/pLysS

4.2.5.1. Оптимизация культивирования рекомбинантного штамма *E.coli*

Предполагалось, что новая система экспрессии, включающая вектор pET24a(+) и собственно штамм *E.coli* BL21(DE3) CodonPlus/pLysS, обеспечит высокий уровень экспрессии гена одноцепочечной AfПА. В векторе pET24a(+) экспрессия гена находится под контролем T7 промотора, а указанный выше штамм *E.coli* содержит ген T7 РНК-полимеразы и является дефицитным по протеазам La и Omp. Таким образом, с одной стороны высокий уровень экспрессии достигается на стадии транскрипции за счет сильного T7 промотора и T7 РНК-полимеразы. С другой стороны, присутствует некоторая защита рекомбинантного белка от действия протеаз La и Omp.

Культивирование рекомбинантного штамма-продуцента в условиях для wt-AfПА (15°C; 0,1 мМ IPTG; 65 ч) показало, что выход по активности sc-AfПА в 25 раз меньше (200 Ед./л среды) по сравнению с исходным ферментом дикого типа (5000 Ед./л среды). В статье [86] также указывался низкий уровень экспрессии одноцепочечных (пермутированных) форм ЕсПА по сравнению с ферментом дикого типа, который не был связан с внутриклеточным протеолизом целевого белка при культивировании в штамме *E.coli* XL1-Blue (30°C; 0,02 мМ IPTG; 3 ч). Уровень экспрессии составлял 3-39% (выход по активности) от уровня экспрессии ЕсПА дикого типа.

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. 4.6). Здесь следует уточнить, что в таблице 4.6 указаны данные на момент окончания культивирования, и, в частности, для двух одноцепочечных форм sc-AfПА1 и sc-AfПА2 максимальная активность наблюдалась при 48 ч культивирования (214 и 230 Ед/л среды соответственно) при 15°C, и при 24 ч культивирования (832 и 669 Ед/л среды соответственно) при 20°C, и далее активность понижалась.

Таблица 4.6.

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 mM IPTG.

**Температура и продолжительность культивирования после индукции.

Наблюдаемые отличия в уровне экспрессии ферментов AfПА (табл. 4.6) могут быть обусловлены различиями в локализации процессов фолдинга и накопления рекомбинантного белка в клетке-продуценте *E.coli*. Для AfПА дикого типа Sec-система транспортировки полипептида-предшественника из цитоплазмы в периплазму клетки *E.coli* предусматривает фолдинг и созревание гетеродимерной AfПА в периплазме [44]. В отличие от AfПА дикого типа, фолдинг и накопление одноцепочечной AfПА протекает в цитоплазме клетки *E.coli*. Цитоплазма и периплазма клетки *E.coli* отличаются по биохимическому составу (наличие протеаз, шаперонов) и окислительно-восстановительному потенциалу, что имеет значение при образовании дисульфидной связи. Известно, что существуют цитоплазматические протеазы, а также белки теплового шока, которые также могут обладать протеолитической активностью и деградировать синтезируемые белки в ответ на физиологический стресс. Условия, в которых клетка *E.coli* тратит свои ресурсы на синтез рекомбинантного белка, составляющего, например, 15% всего белка клетки, относятся к неблагоприятным условиям для нормальной жизнедеятельности бактерии. Эта ситуация усложняется в тех случаях, когда

рекомбинантный белок токсичен для клетки, то есть распространяет свою активность на цитоплазматические субстраты, приводя к их деградации.

Теоретически фермент дикого типа и его одноцепочечная форма имеют следующие отличия. Поскольку фолдинг происходит котрансляционно, для одноцепочечной sc-AfПА он начинается с β -субъединицы, а для фермента дикого типа – с сигнальной последовательности и затем α -субъединицы. В литературе не раз упоминалось, что β -пептид не способен сворачиваться самостоятельно из-за наличия гидрофобных участков на своей поверхности [44, 55]. Но нельзя исключать факторы, способствующие обратному порядку фолдинга, например, работу цитоплазматических шаперонов. Следующее отличие в том, что активация фермента дикого типа происходит в периплазме, в то время как одноцепочечная sc-AfПА синтезируется в активной форме в цитоплазме. Возможно, в природе фермент транспортируется в периплазму из-за токсичности. Так некоторые исследователи полагают, что ПА-активность может быть токсична для клеток-продуцентов *E.coli* [20, 190, 191].

Здесь нужно рассмотреть несколько других моментов, а именно отщепляется ли остаток метионина на N-конце полипептидной цепи sc-AfПА и насколько успешно протекает фолдинг sc-AfПА при участии только цитоплазматических шаперонов. Оба случая приводят к образованию неактивного белка либо из-за отсутствия свободного каталитического остатка серина на N-конце цепи, либо из-за неправильной трехмерной структуры.

Система экспрессии была создана на основе штамма *E.coli* BL21(DE3) CodonPlus/pLysS. Как уже было сказано, культивирование рекомбинантного штамма-продуцента в условиях для wt-AfПА показало, что выход по активности sc-AfПА в 25 раз меньше (~200 Ед./л среды) по сравнению с исходным ферментом дикого типа (~5000 Ед./л среды) (в равных условиях, 15°C). Поэтому была проведена оптимизация условий культивирования с целью повысить долю активной и растворимой рекомбинантной sc-AfПА в общем растворимом клеточном белке и выполнена серия культивирований в разных условиях (табл. 4.7 и 4.8).

Сравнительный анализ литературных данных по культивированию рекомбинантной ПА дикого типа показал, что эффективность экспрессии зависит от ряда параметров (Обзор литературы, п. 2.10). К ним относятся собственно система экспрессии – вектор, промотор и штамм-продуцент, – а также условия культивирования рекомбинантного штамма-продуцента, а именно тип и объем среды, процент посевого, тип и концентрация индуктора, время индукции, температура и продолжительность культивирования.

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

Температура культивирования и концентрация индуктора оказали наибольшее влияние на выход активного фермента. Добавление хлорида кальция до конечной концентрации 2 мМ CaCl_2 увеличивает выход в 1,5-2 раза двух форм одноцепочечной AfПА, а в случае фермента дикого типа wt-AfПА повышение выхода незначительное (на 3%). Условия: среда 2YT; 20°C; 24 ч; 0,1 мМ IPTG; 0 мМ/2 мМ CaCl_2).

Таблица 4.7.

Оптимизация культивирования sc-AfPA1.

#	Температура, °C	Среда	Объем среды, мл	ИРТG, мМ	время индукции, A _{600nm}	CaCl ₂ , мМ	фосфаты, г/л	максимальная активность (ч после индукции)
Система экспрессии: плазида на основе pBR322, штамм <i>E.coli</i> TG1								
1	20	YE	150	0,1	1	2	–	15.5 (4 Ед/л)
	20	YE*	150	0,1	1	2	1	17.5 (89 Ед/л)
	20	2YT*	150	0,1	1	2	1	13 (66 Ед/л)
2	20	YE	120	0,1	0,7	2	–	20,5 (25 Ед/л)
	20	YE	120	0,1	0,55	2	–	14 (8 Ед/л)
Система экспрессии: плазида pET24a+, штамм <i>E.coli</i> BL(DE3) CodonPlus/pLysS								
3	20	YE	150	0,1	1	2	–	19,5
	20	YE	150	0,1	0,65	2	–	18
4	30	YE	150	0,1	0,6	2	–	3
5	20	YE	150	0,1	–	1	–	19
	20	YE	150	0,1	–	1	2,5	19
	20	2YT	150	0,1	–	1	–	20
	20	2YT	150	0,1	–	1	2,5	20 (958 Ед/л)
6	25	2YT	150	0,1	0,75	2	2,5	17
	25	2YT	150	лактоза 10 г/л	0,85	2	2,5	17
	25	2YT	150	0,1	0,5	2**	2,5	17
7	20	2YT	100	0,1	0,7	2	2,5	17 (938 Ед/л)
	20	2YT	150	0,1	0,8	2	2,5	17
	20	2YT	200	0,1	0,7	2	2,5	17
	20	2YT	250	0,1	0,7	2	2,5	17
8	20	2YT	100	0,1	0,4	2	–	24 (832 Ед/л)

*Среда содержала сульфат магния 0,1 г/л

**В виде CaNa₂ЭДТА.

Таблица 4.8.

Оптимизация культивирования sc-AfПА2.

#	Температура, °С	Среда	Объем среды, мл	IPTG, мМ	время индукции, A _{600nm}	CaCl ₂ , мМ	фосфаты	% посевого	максимальная активность (ч после индукции)
Система экспрессии: плазида pET24a+, штамм <i>E.coli</i> BL(DE3) CodonPlus/pLysS									
1	20	2YT	100	0,1	0,4	2	–	10	24 (669 Ед/л)
2	20	2YT	100	0,05	0,7	2	–	10	19 (646 Ед/л)
	20	2YT	100	0,1	0,7	2	–	10	19 (594 Ед/л)
	20	2YT	100	0,25	0,7	2	–	10	29
	20	2YT	100	0,5	0,7	2	–	10	44
	20	2YT	100	1,0	0,7	2	–	10	44
3	20	2YT	100	0,1	0,1	2	–	10	19
	20	2YT	100	0,1	0,3	2	–	10	16
	20	2YT	100	0,1	0,5	2	–	10	15
	20	2YT	100	0,1	0,7	2	–	10	14
	20	2YT	100	0,1	0,9	2	–	10	13 (588 Ед/л)
4	25	2YT	100	0,1	1,3	2	–	10	4
5	30	2YT	100	0,1	1,2	2	–	10	3
6	15	2YT	100	0,1	1,1	2	–	10	47
7	20	2YT	100	0,1	1,0	0,0	–	10	19,5 (572 Ед/л)
	20	2YT	100	0,1	1,1	0,1	–	10	24
	20	2YT	100	0,1	1,0	0,2	–	10	24
	20	2YT	100	0,1	1,1	0,5	–	10	24
	20	2YT	100	0,1	1,1	1,0	–	10	19,5
	20	2YT	100	0,1	1,1	2,0	–	10	19,5
	20	2YT	100	0,1	1,1	5,0	–	10	17,5
	20	2YT	100	0,1	1,1	10,0	–	10	17,5
8	20	2YT	100	0,1	0,4	2	–	1	17
	20	2YT	100	0,1	0,9	2	–	4	14
	20	2YT	100	0,1	0,8	2	–	7	17 (494 Ед/л)
	20	2YT	100	0,1	1,1	2	–	10	17
	20	2YT	100	0,1	0,9	2	–	15	18

Было обнаружено, что температура культивирования оказывает наибольшее влияние на выход белка. При температуре 15°C выход растворимой sc-AfПА был самым низким, в то время как для фермента дикого типа это оптимальная температура. Температура 20°C обеспечивает максимальный выход растворимой sc-AfПА. При температуре 30°C наблюдается самый высокий уровень экспрессии одноцепочечной AfПА, но белок практически полностью накапливается в

нерастворимой форме. Действие других параметров не оказывает явного эффекта на выход одноцепочечной АфПА.

Так как процессы транскрипции и трансляции ускоряются с повышением температуры, можно ожидать увеличение уровня экспрессии рекомбинантного белка, но также и увеличение активности протеаз и белков теплового шока, так как при повышенных температурах клетка испытывает более высокую метаболическую нагрузку. Таким образом, необходим поиск таких условий, которые обеспечивали бы максимальный уровень экспрессии при минимальной деградации рекомбинантного белка.

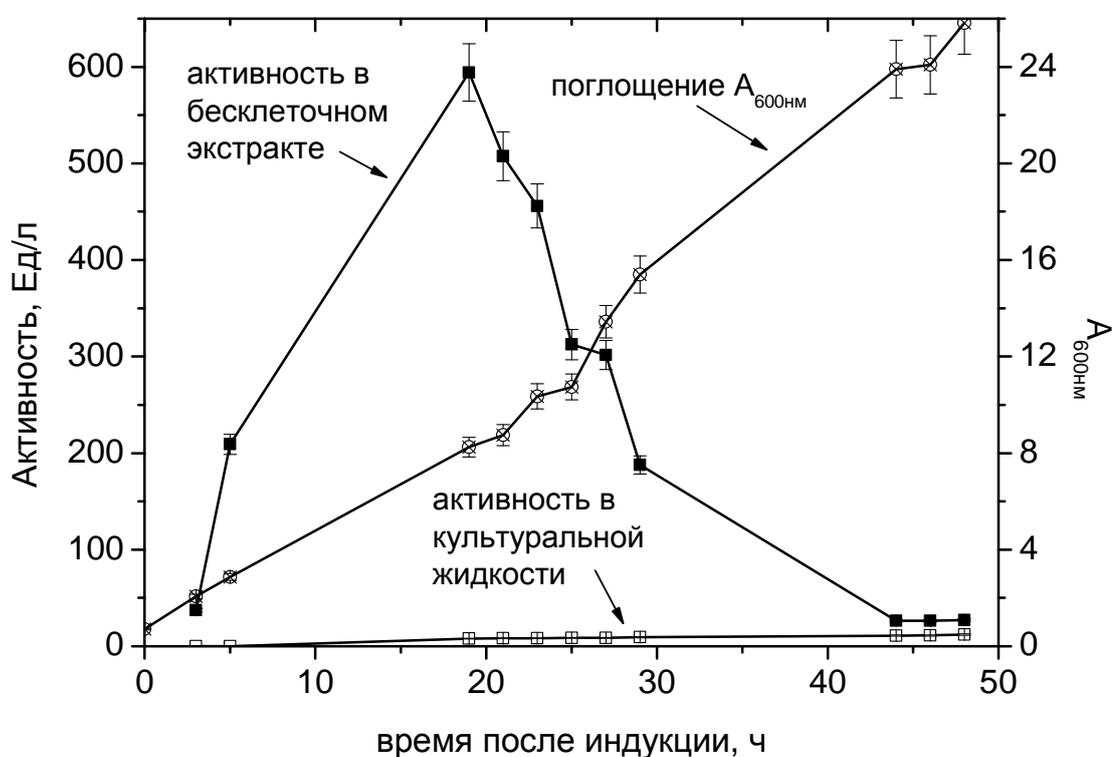


Рис. 4.17. Экспрессия второго варианта одноцепочечной формы sc-AfПА2 в клетках *E.coli* BL21(DE3) CodonPlus/pLysS (2YT, 20°C, 0,1 mM IPTG). Кривая роста как функция поглощения культуры клеток на 600 нм от времени (⊗) соответствует оси справа. Зависимости активности от времени культивирования в бесклеточном экстракте (■) и в среде (□) относятся к оси слева.

Следует сказать, что воспроизводимость экспериментов по культивированию низкая, и это обусловлено наличием множества параметров, оказывающих влияние на рост бактериальной культуры, а также на точность отбора проб (концентрация

клеток и количество белка в пробе) и погрешность измерения плотности культуры бактерий ($A_{600\text{нм}}$). Например, культивирование второго варианта одноцепочечной пенициллинацилазы sc-AfПА2 при 20°C и в стандартных условиях (среда 2YT, индукция 0,1 мМ IPTG, 2 мМ CaCl₂) приводило к максимальной активности от 494 до 670 Ед/л среды. Прежде всего, это объясняется особенностью профиля активности в бесклеточном экстракте. Здесь имеет место резкое повышение активности после 6 ч культивирования, а примерно после 17 ч активность уменьшается (рис. 4.17). Похожие результаты получены в работе [132], где максимальная ПА-активность наблюдалась при 16 ч культивирования (температура после индукции 28°C).

В связи с поздней индукцией и общей продолжительностью культивирования возможность отбирать пробы в интервале 8-17 ч отсутствовала. Поэтому не удалось зафиксировать истинный максимум.

На рис. 4.17 видно, что наблюдаемое понижение активности происходит, когда культура клеток находится в экспоненциальной фазе развития, а также что вклад клеточного лизиса невелик. Падение активности в данном случае может быть следствием протеолитической деградациии либо образования нерастворимых телец включения. В свою очередь, причина протеолиза может заключаться как в токсичности одноцепочечного (пермутированного) белка для клетки, так и в реакции клетки на физиологический стресс и голодание, то есть представляет собой ответ на неблагоприятные условия жизнедеятельности.

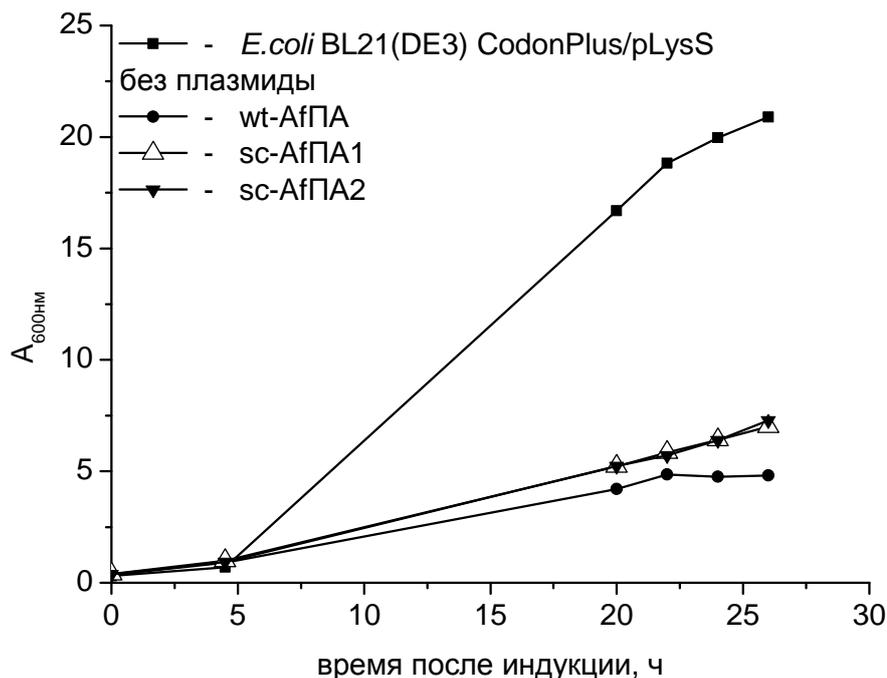


Рис. 4.18. Кривая роста для клеток *E.coli* BL21(DE3) CodonPlus/pLysS без плазмиды (■) и несущих плазмиду фермента дикого типа wt-AfПА (●), двух одноцепочечных форм sc-AfПА1 (Δ) и sc-AfПА2 (▼). Условия: 2YT, 20°C, 0,1 mM IPTG.

Из литературы известно, что индукция синтеза рекомбинантного белка замедляет клеточный рост и другие процессы жизнедеятельности бактерии *E.coli* [192]. Это хорошо видно на рис. 4.18, на котором можно заметить более высокую в пределах погрешности скорость роста клеток, экспрессирующих одноцепочечные формы фермента, если сравнивать с ферментом дикого типа. Такое различие может говорить о более низком уровне экспрессии по сравнению с ферментом дикого типа.

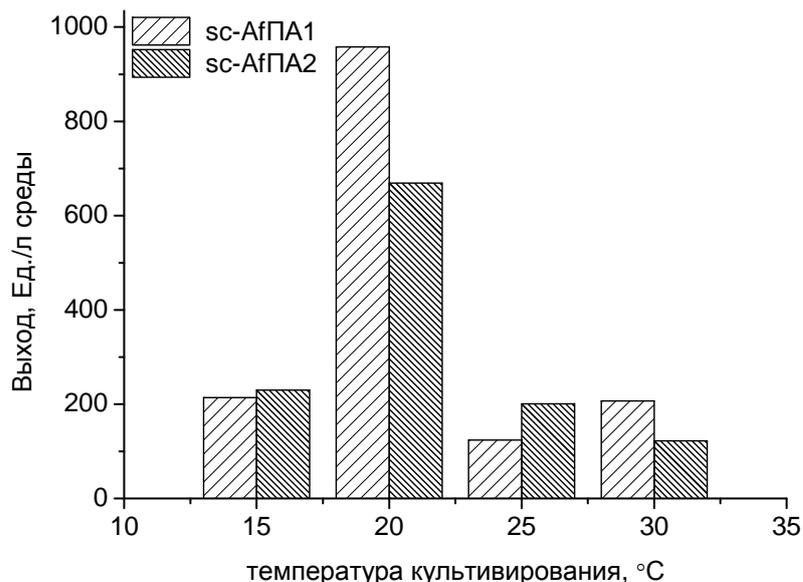


Рис. 4.19. Зависимость выхода активного фермента sc-AfPA1 и sc-AfPA2 от температуры культивирования.

Из диаграммы, изображенной на рис. 4.19, следует, что наибольший выход наблюдается при температуре культивирования 20°C. Дополнительный анализ растворимой и нерастворимой фракции общего белка клетки методом электрофореза (п. 4.2.5.2) свидетельствует, что более низкий выход активного и растворимого фермента при повышенных температурах (25 и 30°C) связан с преимущественным накоплением белка в виде нерастворимых агрегатов. Низкий уровень растворимого белка при 15°C связан, вероятно, с особенностью кинетики фолдинга при пониженных температурах. Тем не менее, если сравнить экспрессию фермента дикого типа в одинаковых условиях при 15°C, то количество активного фермента будет на порядок выше, чем выход одноцепочечной AfPA (табл. 4.6).

Таким образом, в результате оптимизации условий культивирования были выбраны оптимальные условия, позволяющие получить до 600-900 Ед/л активной и растворимой одноцепочечной AfPA, что соответствует 8-12 мг белка с литра среды.

4.2.5.2. Анализ растворимого/нерастворимого белка клетки

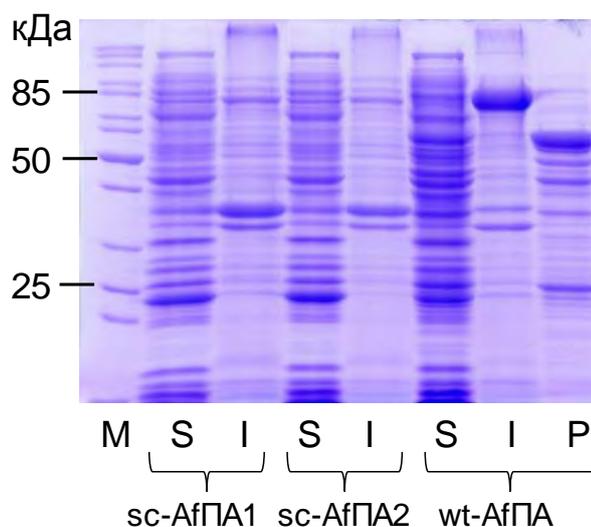


Рис. 4.20. Аналитический SDS-ПААГ электрофорез образцов sc-AfПА1, sc-AfПА2 и wt-AfПА после культивирования (20°C; 24 ч; 0,1 мМ IPTG; *E.coli* BL21(DE3) CodonPlus/pLysS). М – маркер молекулярной массы, S – растворимая фракция (бесклеточный экстракт), I – нерастворимая фракция (клеточный осадок), P – периплазматический экстракт.

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 рис. 4.20 показан электрофорез образцов фермента дикого типа и его двух одноцепочечных форм. Исходя из ширины полос можно предположить, что уровень экспрессии одноцепочечных форм sc-AfПА1 и sc-AfПА2 не превышает 2% всего растворимого белка клетки. 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 без сигнального пептида и о накоплении

sc-AfПА в нерастворимой форме. Для подтверждения гипотезы требуется дополнительный анализ гелей методом Вестерн-блот.

На рис. 4.21 приведен аналогичный электрофорез с дополнительными дорожками для растворимого и нерастворимого белка штамма *E.coli* BL21(DE3) CodonPlus/pLysS без плазмиды. Из рис. 4.21 видно, что две интенсивные полосы в районе 30-40 кДа также присутствуют и в исходном штамме *E.coli* и не могут быть продуктами деградации рекомбинантного белка.

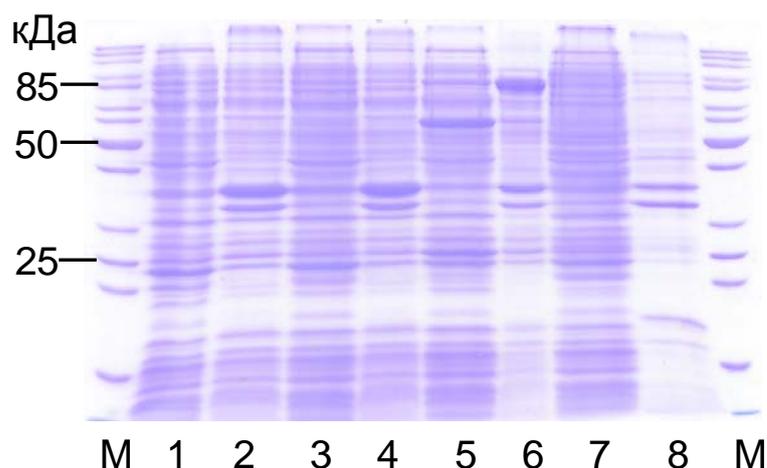


Рис. 4.21. Аналитический SDS-ПААГ электрофорез проб после культивирования (20°C, 24 ч; 0,1 мМ IPTG; *E.coli* BL21(DE3) CodonPlus/pLysS): растворимая/нерастворимая фракции для sc-AfПА1 (1-2), sc-AfПА2 (3-4), wt-AfПА (5-6) и клеток *E.coli* без плазмиды (7-8).

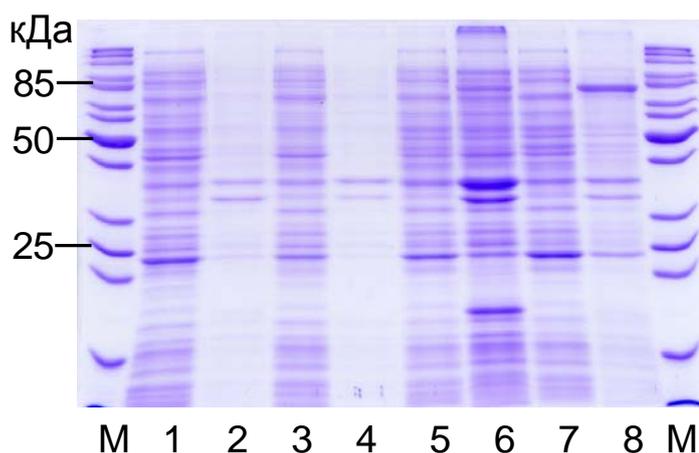


Рис. 4.22. Аналитический SDS-ПААГ электрофорез растворимых (Р) и нерастворимых (НР) фракций после культивирования sc-AfПА2 при температуре 15°C (1 – Р, 2 – НР), 20°C (3 – Р, 4 – НР), 25°C (5 – Р, 6 – НР) и 30°C (7 – Р, 8 – НР); М – маркер молекулярной массы.

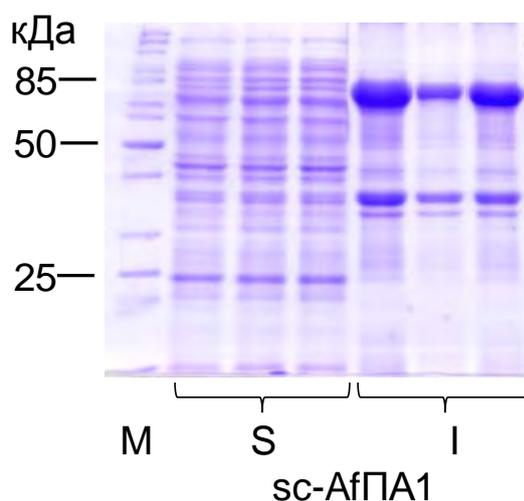


Рис. 4.23. Аналитический SDS-ПААГ электрофорез образцов sc-AfПА1 после культивирования (30°C; 4 ч; 0,1 мМ IPTG; *E.coli* BL21(DE3) CodonPlus/pLysS). М – маркер молекулярной массы, S – растворимая фракция (бесклеточный экстракт), I – нерастворимая фракция (клеточный осадок). Культивирование проводилось в трех повторях, поэтому представлено по три дорожки для каждой фракции.

Поскольку температура оказывает значительный вклад в общий уровень экспрессии, а повышение температуры часто увеличивает долю нерастворимого белка, было решено сделать электрофорез образцов *E.coli* после культивирования при температуре 15°C, 20°C, 25°C и 30°C (рис. 4.22). Сравнение растворимых фракций позволяет делать вывод об одинаковом составе и количестве растворимого белка в исследованном диапазоне температур. Электрофорез нерастворимого белка для 30°C заметно отличается благодаря наличию той же самой полосы массой около 85 кДа, что и на рис. 4.20. В связи с этим можно предполагать, что уровень экспрессии одноцепочечной формы sc-AfПА достигает наибольшего значения при температуре культивирования 30°C, и фермент накапливается преимущественно в нерастворимой форме (рис. 4.23).

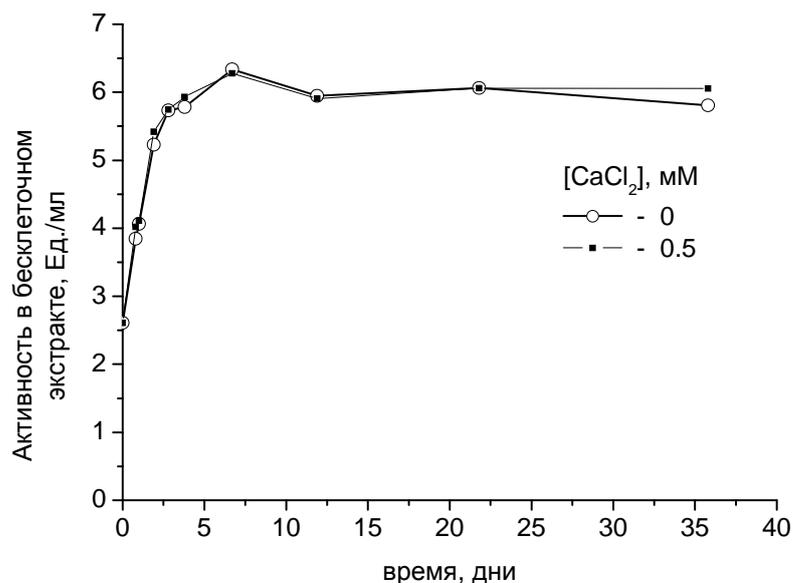


Рис. 4.24. Профиль активности в бесклеточном экстракте после культивирования sc-AfПА2 при хранении (4°C, 0.02 M TrisHCl, pH 8.0).

Случайно было обнаружено, что при хранении sc-AfПА2 в бесклеточном экстракте после разрушения клеток *E.coli* ультразвуком (0,02 M TrisHCl, pH 8,0; 4°C) активность возрастает примерно в 3 раза и достигает постоянного значения (рис. 4.24). Соответствующий эксперимент для sc-AfПА1 и контрольный эксперимент для wt-AfПА не проводили.

Согласно литературным данным, фолдинг рекомбинантной пенициллинацилазы из *Alcaligenes faecalis* дикого типа происходит в периплазме клетки *E.coli*, так как сигнальная последовательность активирует Sec-систему транспортировки. Таким образом, wt-AfПА приобретает третичную структуру только в периплазме *E.coli*, а значит, требует только периплазматические шапероны. Фолдинг одноцепочечной sc-AfПА протекает *a priori* в цитоплазме *E.coli*, и, вероятно, цитоплазматические шапероны здесь менее эффективны. Мы предполагаем, что при контакте с одноцепочечной ПА, локализованной в цитоплазме *E.coli*, периплазматические шапероны способствуют завершению процесса фолдинга белка.

При инкубировании экстракта разрушенных клеток *E.coli* также наблюдалось увеличение активности sc-AfПА.

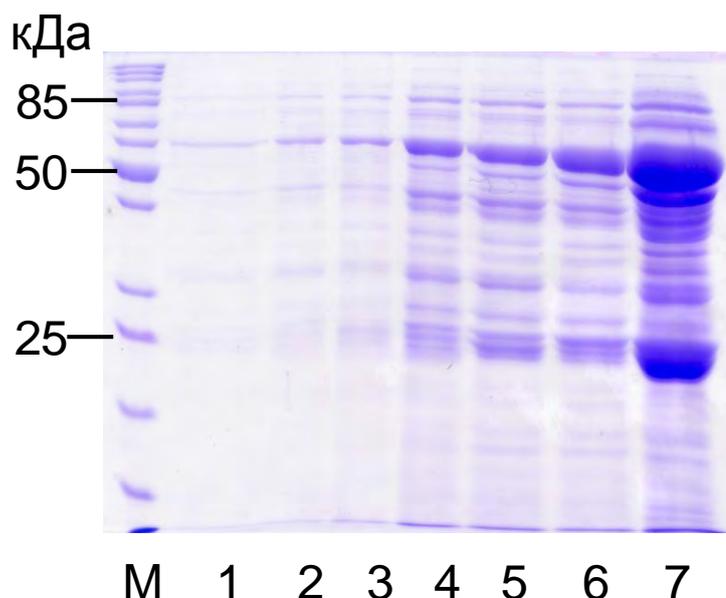


Рис. 4.25. Аналитический SDS-ПААГ электрофорез образцов, отбираемых в процессе культивирования wt-AfПА (периплазматический экстракт; через 15, 18, 23, 39, 42, 47, 66 ч после индукции; дорожки № 1-7; YE; 15°C). М – маркер молекулярной массы. Система экспрессии: вектор на основе pBR322, штамм *E.coli* TG1.

На рис. 4.25 можно проследить за экспрессией белка в клетках *E.coli* TG1. На электрофореze можно выделить две интенсивные полосы, которые по молекулярной массе соответствуют α - и β -субъединице фермента дикого типа. Из высокой интенсивности полос следует, что рекомбинантный белок составляет значительную долю в общем растворимом белке периплазмы. Если проанализировать аналогичный электрофорез образцов для штамма *E.coli* BL21(DE3) CodonPlus/pLysS (рис. 4.26), то видно, что по сравнению с предыдущим случаем (рис. 4.25) синтез wt-AfПА начинается раньше, а содержание белка wt-AfПА в периплазме увеличивается незначительно.

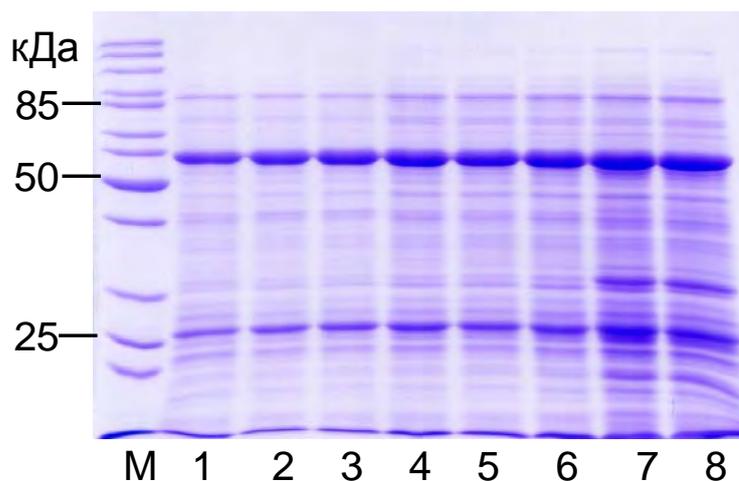


Рис. 4.26. Аналитический SDS-ПААГ электрофорез образцов, отбираемых в процессе культивирования wt-AfPA (периплазматический экстракт; через 14, 17, 20, 37, 41, 45, 61, 65 ч после индукции; дорожки № 1-8; 2YT; 15°C) М – маркер молекулярной массы. Система экспрессии: вектор pET24a(+), штамм *E.coli* BL21(DE3) CodonPlus/pLysS.

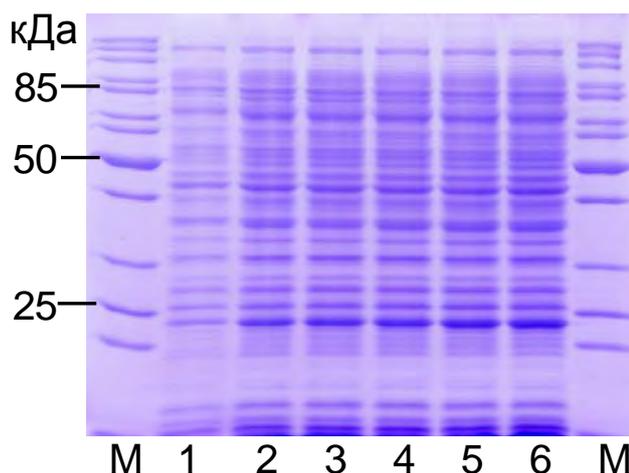


Рис. 4.27. Аналитический SDS-ПААГ электрофорез образцов, отбираемых в процессе культивирования sc-AfPA2 (бесклеточный экстракт; через 3, 16, 18, 20, 22 и 24 ч после индукции; дорожки № 1-6; 20°C). М – маркер молекулярной массы. Система экспрессии: вектор pET24a(+), штамм *E.coli* BL21(DE3) CodonPlus/pLysS.

Если смотреть динамику экспрессии по электрофорезу общего растворимого белка клетки (рис. 4.27), то, по всей видимости, после 16 ч культивирования не происходит заметного накопления ни одного из белков данной фракции.

4.2.6. Рефолдинг sc-AfPA из телец включения

4.2.6.1. Выбор методики рефолдинга

Поскольку на электрофореze нерастворимой фракции (культивирование при температуре 30°C; рис. 4.23) была обнаружена широкая полоса, соответствующая по массе одноцепочечной AfПА, было решено провести рефолдинг фермента из клеточного осадка. На основании анализа литературы по рефолдингу была выбрана следующая методика. Сначала клеточный осадок отмывали от растворимых примесей и затем солюбилизировали в растворе 8 М мочевины. Раствор для рефолдинга содержал 0,05 М TrisHCl (pH 7,5), 0,15 М NaCl, хлорид кальция и Triton X100. Для рефолдинга была использована относительно простая методика, и в дальнейшем планируется разработка более эффективных условий солюбилизации и состава буфера для рефолдинга, а также изучение кинетики рефолдинга.

4.2.6.2. Результаты рефолдинга двух вариантов одноцепочечной AfПА

В результате рефолдинга первого варианта одноцепочечной sc-AfПА1 активность наблюдалась при разбавлении исходного раствора солюбилизованного клеточного осадка до конечной концентрации мочевины 1,0 М (восстановлено 0,7 единиц активности). При рефолдинге второго варианта sc-AfПА2 максимальная активность наблюдалась при концентрации мочевины 0,3 М (рис. 4.30). Из рис. 4.28–4.30 можно сделать вывод, что эффективность рефолдинга зависит от степени разбавления белка, концентрации мочевины и продолжительности рефолдинга.

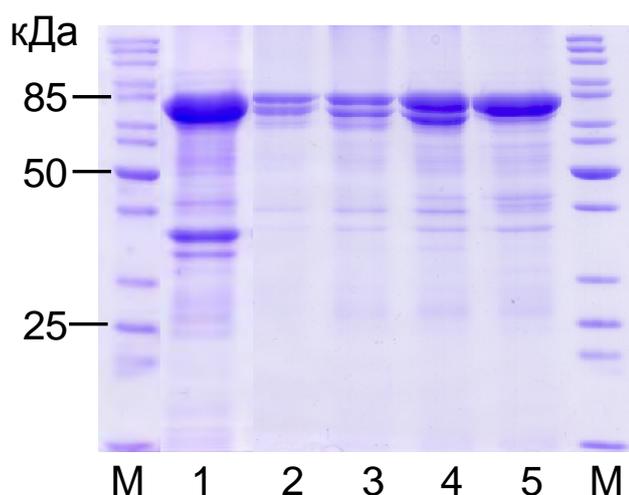


Рис. 4.28. Рефолдинг первого варианта одноцепочечной sc-AfПА1. Аналитический SDS-ПААГ электрофорез, 1 – нерастворимая фракция после культивирования 4 ч при 30°C, 2-5 – образцы sc-AfПА1 после рефолдинга (разбавление белка в 8, 5, 4 и 3 раза; конечная концентрация мочевины 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 М).

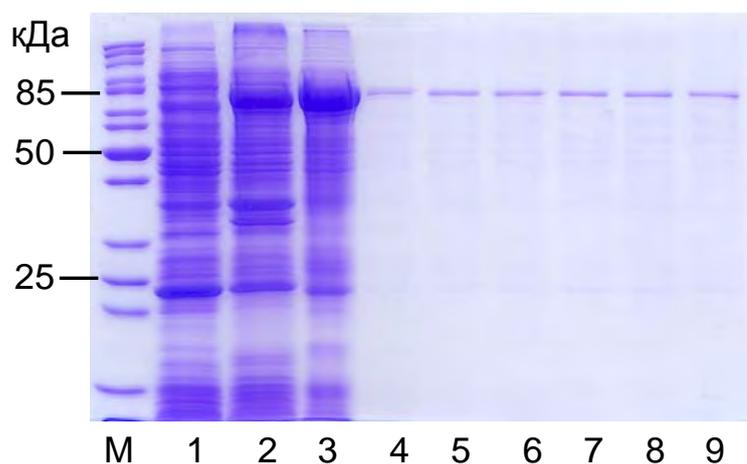


Рис. 4.29. Рефолдинг второго варианта одноцепочечной AfПА. Аналитический SDS-ПААГ растворимой (1), нерастворимой (2) фракции после культивирования 24 ч при 30°C, 3 – солюбилизированный клеточный осадок в 8 М мочеvine, 4-9 – образцы sc-AfПА2 после рефолдинга (разбавление белка в 40 раз; конечная концентрация мочевины 2,5; 2,0; 1,5; 1,0; 0,8; 0,5 М).

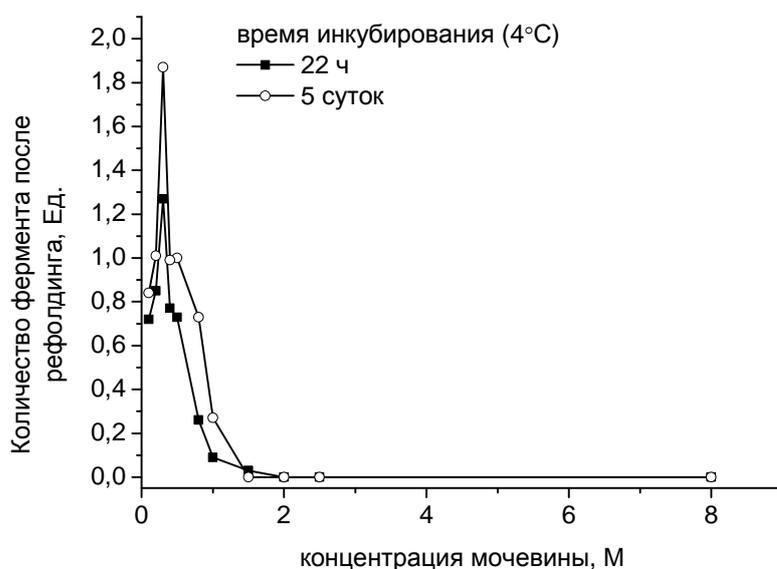


Рис. 4.30. Зависимость количества единиц фермента sc-AfПА2 после рефолдинга от итоговой концентрации мочевины в буфере для рефолдинга.

Таким образом, была показана возможность успешного рефолдинга двух вариантов одноцепочечной AfПА. Дальнейшее изучение кинетики и оптимизация условий рефолдинга 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 sc-AfПА. Из электрофореграмм на рис. 4.23, 4.28 и 4.29 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.

4.2.7. Разработка методики очистки sc-AfПА

Стандартная методика очистки, разработанная ранее для фермента дикого типа, включала получение периплазматического экстракта, фракционирование сульфатом аммония и гидрофобную хроматографию (Toyopearl Butyl 650M). Данная схема очистки оказалась недостаточной для одноцепочечной AfПА, и потребовалась дополнительная стадия ионообменной хроматографии (MonoQ 10/100 GL). Мы также предприняли попытку очистки sc-AfПА из бесклеточного экстракта только ионообменной хроматографией. Оказалось, что ни гидрофобная, ни ионообменная хроматография, взятая по отдельности, не позволяет получить гомогенный препарат фермента. Об этом свидетельствует аналитический электрофорез фракций после хроматографии (рис. 4.32, дорожка 3; рис. 4.34).

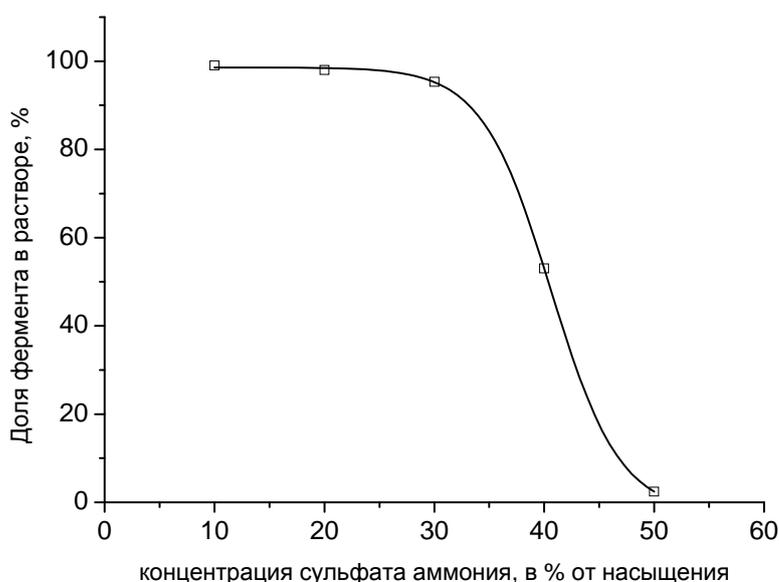


Рис. 4.31. Зависимость растворимости первого варианта одноцепочечной формы sc-AfПА1 от концентрации сульфата аммония.

Определение концентрации сульфата аммония, при которой достигается осаждение одноцепочечной формы пенициллинацилазы (рис. 4.31), показало, что при концентрации 50% от насыщения (25°C) остаточная активность sc-AfПА1 составляет не более 2,5 процентов. Для осаждения фермента была выбрана концентрация сульфата аммония 70% от насыщения.

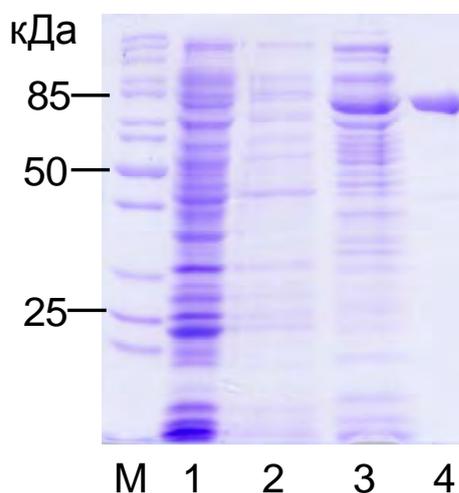


Рис. 4.32. Аналитический SDS-ПААГ электрофорез образцов sc-AfПА2 на разных этапах очистки. М – маркер молекулярной массы, 1 – бесклеточный экстракт в 0,02 М TrisHCl pH 8,0 (после разрушения клеток), 2 – бесклеточный экстракт в 1,5 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,05 М KH_2PO_4 , 0,1 М KCl, pH 8,0; 3 – фракция после гидрофобной хроматографии, 4 – фракция после ионообменной хроматографии.

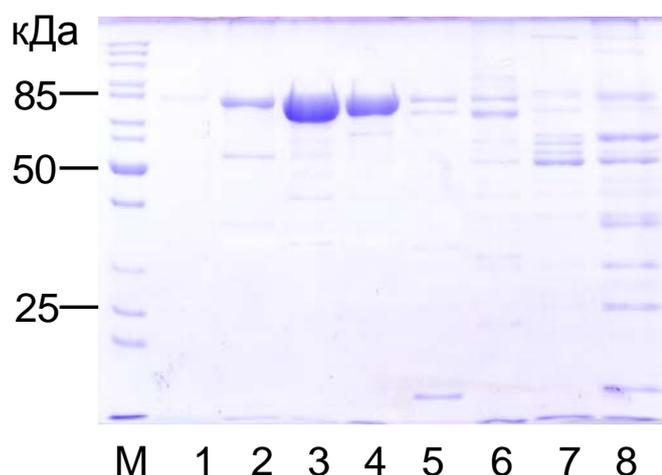


Рис. 4.33. Аналитический SDS-ПААГ электрофорез фракций sc-AfПА1 после ионообменной хроматографии MonoQ 5/50GL. М – маркер молекулярной массы, 2-4 – фракции с наибольшей активностью.

Последующая очистка методом ионообменной хроматографии позволила получить практически гомогенный белок (рис. 4.32, дорожка 4; рис. 4.33,

дорожка 3). Разработанная методика демонстрирует эффективность последовательного применения двух принципиально разных методов хроматографии.

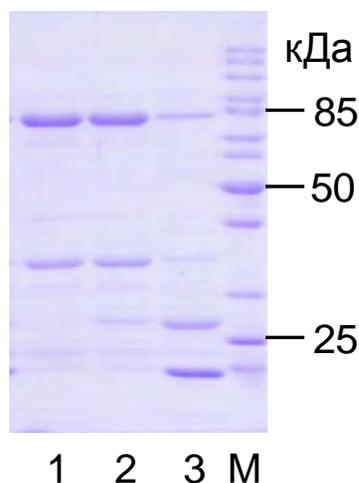


Рис. 4.34. Аналитический SDS-ПААГ электрофорез активных фракций sc-AfПА2 (1-3): очистка из бесклеточного экстракта только ионообменной хроматографией (MonoQ).

Электрофорез активных фракций, полученных очисткой из бесклеточного экстракта только ионообменной хроматографией, показал, что sc-AfПА2 содержит много примесных белков и чистота составляет не более 50% (рис. 4.34). На хроматограмме нельзя было выделить отдельного пика, соответствующего sc-AfПА2, так как в этой области градиента (5-15%) детектировалось множество пиков с плохим разрешением. В таблицах 4.9–4.11 приведены параметры очистки для wt-AfПА дикого типа и двух одноцепочечных вариантов sc-AfПА1-2.

Таблица 4.9.

Таблица очистки sc-AfПА1.

#	Этап очистки	Активность, Ед/мл	Объем, мл	Концентрация общего белка, мг/мл	Общая активность, Ед.	Общий белок, мг	Удельная активность, Ед/мг	Степень очистки	Выход, %
1	Бесклеточный экстракт	3,6	92	3,7	334	341	1,0	1,0	100
2	Гидрофобная хроматография (Toyopearl Butyl 650M)	5,5	50	0,6	277	30,1	9,2	9,2	83
3	Анионообменная хроматография; MonoQ 10/100 GL	58,9	3,9	1,6	227	6,3	36,0	36,0	68

Таблица 4.10.

Таблица очистки sc-AfПА2.

#	Этап очистки	Активность, Ед/мл	Объем, мл	Концентрация общего белка, мг/мл	Общая активность, Ед.	Общий белок, мг	Удельная активность, Ед/мг	Степень очистки	Выход, %
1	Бесклеточный экстракт	65,0	0,7	1,3	45	84	0,5	1,0	100,0
2	Гидрофобная хроматография (Toyopearl Butyl 650M)	11,2	2,7	0,4	31	4	7,8	14,7	68,3
3	Анионообменная хроматография; MonoQ 10/100 GL	2,2	8,3	0,3	18	1	26,6	49,8	40,8

Таблица 4.11.

Таблица очистки wt-AfПА.

#	Этап очистки	Активность, Ед/мл	Объем, мл	Концентрация общего белка, мг/мл	Общая активность, Ед.	Общий белок, мг	Удельная активность, Ед/мг	Степень очистки	Выход, %
1	Бесклеточный экстракт	37,5	81,45	6,0	3054	225	13,6	1,0	100,0
2	Гидрофобная хроматография (Toyopearl Butyl 650M)	41,8	58,9	2,2	2465	92	26,8	2,0	80,7
3	Анионообменная хроматография; MonoQ 10/100 GL	11,7	153,9	5,8	1801	68	26,6	2,0	59,0

Для сравнения методики очистки ПА можно заметить, что в работе [12] очистка ПА из *Achromobacter xylosoxidans* включала сочетание двух разных типов хроматографии, гидрофобной хроматографии (Phenyl Sepharose CL-4B; Amersham Pharmacia Biotech) и ионообменной хроматографии (MonoQ HR5/5; Amersham Pharmacia Biotech). Перед второй стадией очистки активные фракции были сконцентрированы методом ультрафильтрации (cut-off 30 кДа) и переведены в другой буферный раствор (20 мМ Tris-HCl; pH 7,5). В целом приведенная методика не имеет принципиальных отличий от нашей методики и отличается только типом носителя для гидрофобной хроматографии и составом буферного раствора для MonoQ (в данной работе pH 8,0) [12].

4.2.8. Характеристика одноцепочечных форм AfПА

Для изучения свойств фермента дикого типа wt-AfПА и двух одноцепочечных форм были использованы очищенные препараты. 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.

4.2.8.1. Изучение каталитических свойств одноцепочечных форм AfПА

Кинетические параметры (K_m , V_m и k_{cat}) определяли спектрофотометрически с хромогенным субстратом NIPAB. На рис. 4.35 показан график зависимости начальной скорости реакции гидролиза субстрата NIPAB от концентрации субстрата, и из него видно, что реакция соответствует типичной кинетике Михаэлиса. Для расчета каталитической константы k_{cat} измеряли концентрацию фермента методом титрования активных центров необратимым ингибитором PMSF (рис. 4.36). Величины кинетических параметров для двух вариантов sc-AfПА и фермента wt-AfПА дикого типа приведены в таблице 4.12. 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.

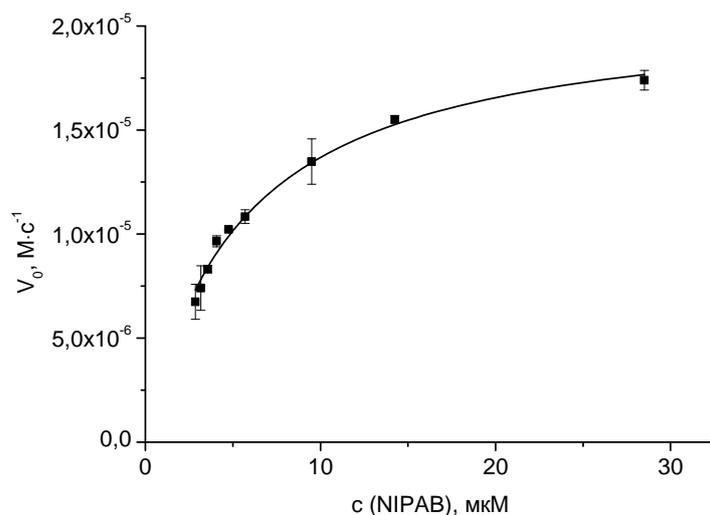


Рис. 4.35. Зависимость начальной скорости реакции гидролиза NIPAB от концентрации субстрата (для sc-AfPIA1).

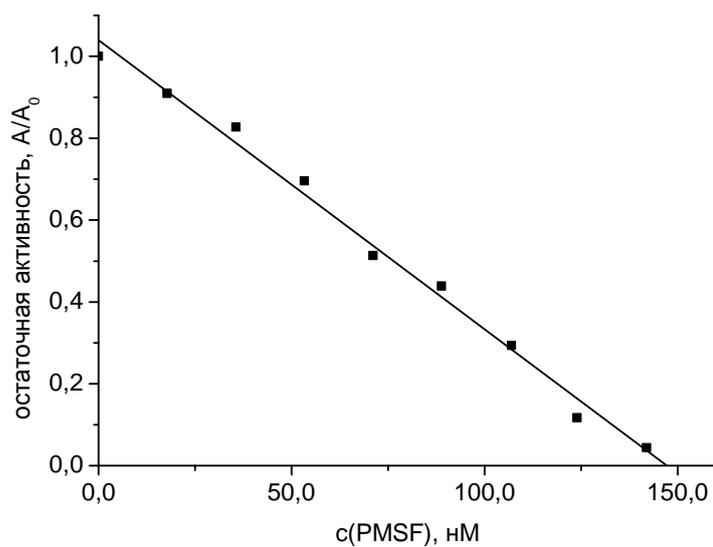


Рис. 4.36. График титрования активных центров sc-AfPIA1 необратимым ингибитором PMSF (0,01 М КН₂РО₄, 0,1 М КСl, рН 6,0; 20,0°С; 10 мин). Условия измерения активности: NIPAB, 0,01 М КН₂РО₄, 0,1 М КСl, рН 8,0; 30,0°С.

Таблица 4.12.

Каталитические параметры (NIPAB; 0,01 М КН₂РО₄, 0,1 М КСl, рН 8,0; 30°С).

Фермент	k_{cat} , с ⁻¹	K_m , μM
wt-AfPIA	138±5	5,2±0,4
sc-AfPIA1	143±1	4,6±0,2
sc-AfPIA2	143±2	4,3±0,2

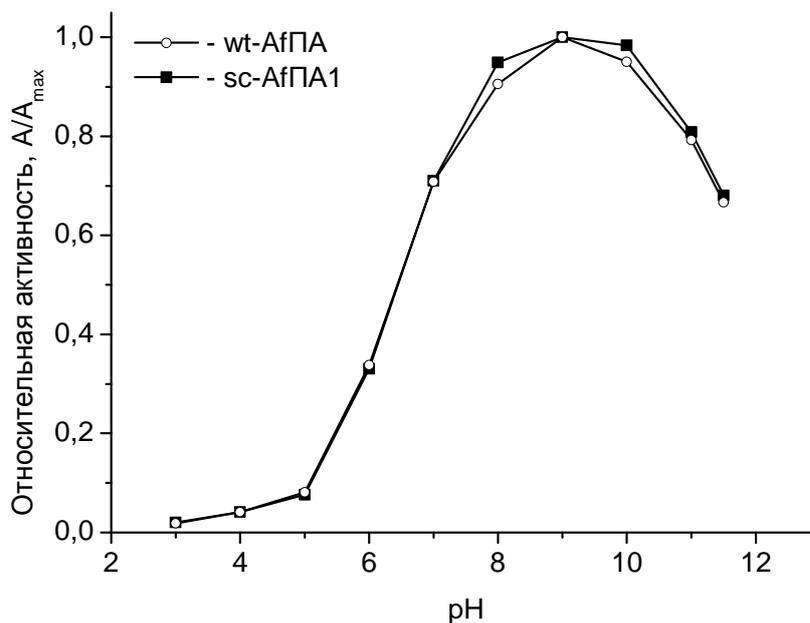


Рис. 4.37. pH-профиль активности для wt-AfПА и sc-AfПА1.

Наблюдаемый вид pH-зависимости активности от pH буферного раствора (рис. 4.37) свидетельствует о наличии двух ионизируемых аминокислотных остатков, участвующих в катализе.

4.2.8.2. Изучение термостабильности одноцепочечных форм AfПА

Термостабильность ферментов изучали в калий-фосфатном буферном растворе. Для этого измеряли кинетику термоинактивации фермента. На данном этапе была исследована зависимость термостабильности от температуры инактивации, концентрации и pH буферного раствора. Инактивация как фермента дикого типа, так и его одноцепочечных форм соответствует кинетике реакции первого порядка. 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. С одной стороны, это может быть связано с наличием в структуре фермента wt-AfПА дисульфидного мостика. Цитоплазма бактерии *E.coli* – менее благоприятная среда

для формирования дисульфидной связи из-за своего окислительно-восстановительного потенциала, если сравнивать с периплазмой.

В случае одноцепочечной ПА ковалентная сшивка двух субъединиц не приводит к повышению термостабильности. Это может быть связано с локальной лабильностью структуры одноцепочечной формы ПА в области соединительной петли или с наличием открытых гидрофобных участков в результате неправильного фолдинга. Об этом сложно рассуждать только по косвенным результатам. При пермутации возникает ряд взаимосвязанных факторов, которые трудно разделить: обращение порядка фолдинга, локализация биосинтеза белка в цитоплазме. Для более точных выводов требуются другие методы, в том числе флуоресценция связанной ANS (8-анилинонафталин-1-сульфоная кислота), спектроскопия кругового дихроизма, кристаллизация и определение трехмерной структуры.

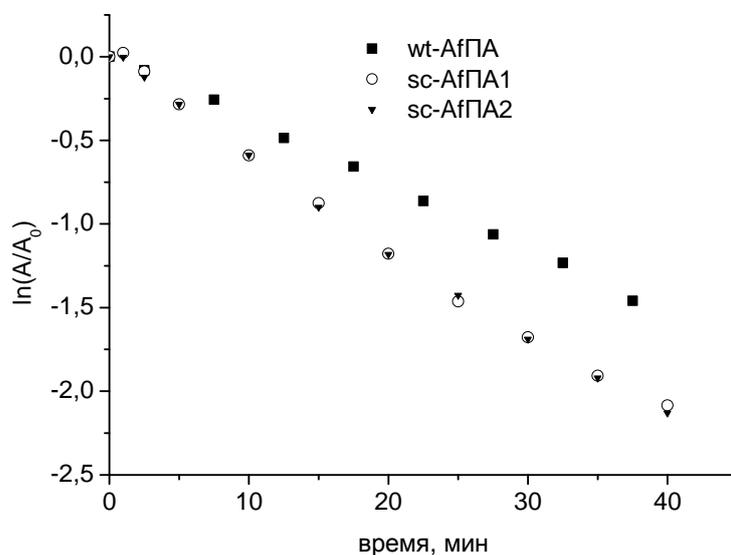


Рис. 4.38. Кинетика термоинактивации в полулогарифмических координатах для wt-AfПА и двух одноцепочечных форм sc-AfПА1 и sc-AfПА2 (0,1 М KH_2PO_4 , pH 8,0; 53°C).

Для сравнения термостабильности фермента дикого типа и его одноцепочечных форм был поставлен отдельный эксперимент, в котором изучали кинетику термоинактивации неочищенных препаратов в одинаковых условиях

(рис. 4.38). Было показано, что оба одноцепочечных варианта sc-AfПА обладают одинаковой термостабильностью ($k_{in}=9,15 \cdot 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ и $9,17 \cdot 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ для sc-AfПА1 и 2 соответственно), которая ниже по сравнению с ферментом дикого типа ($k_{in}=6,48 \cdot 10^{-4} \text{ с}^{-1}$) в 1,4 раза. Свойства очищенных ферментов изучали в разное время, поэтому отличия в полученных константах скорости инактивации могут быть следствием погрешности концентрации и pH буферного раствора, измерения температуры инактивации и разной продолжительности очистки фермента.

Таблица 4.13.

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

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

В таблице 4.13 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 одноцепочечными вариантами.

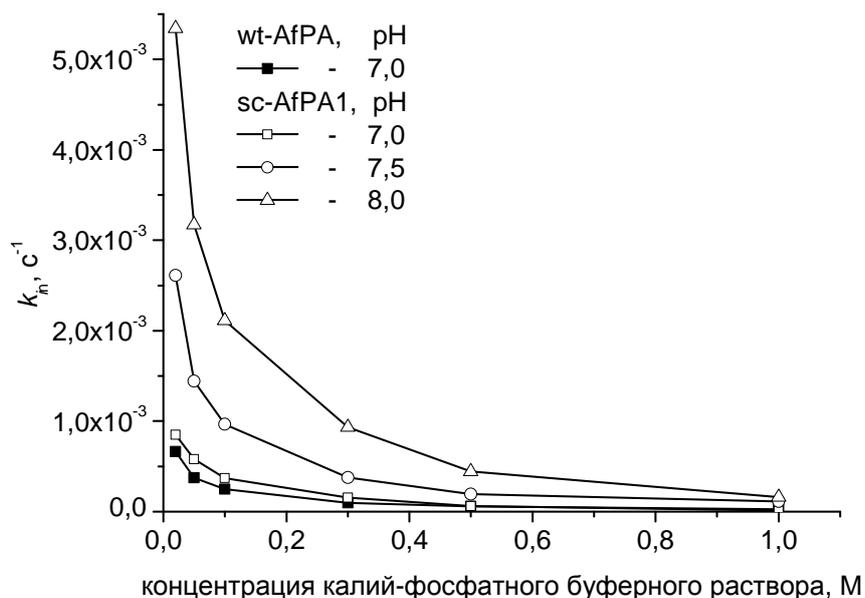


Рис. 4.39. Зависимость величины константы скорости инактивации от концентрации калий-фосфатного буферного раствора для wt-AfPA и sc-AfPA1 (56°C).

Влияние концентрации буферного раствора на кинетику термоинактивации было изучено для фермента дикого типа и первого варианта одноцепочечной sc-AfPA1 при трех значениях pH (рис. 4.39). 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 sc-AfPA1 аналогичны.

Полученные данные о pH-зависимости термостабильности ПА согласуются с результатами статьи [130]. Для ПА из *Achromobacter* sp. ССМ 4824, выделенной из почвы, показано, что понижение pH буферного раствора сопровождается увеличением температурного оптимума и периода полуинактивации, то есть повышением температурной стабильности [130].

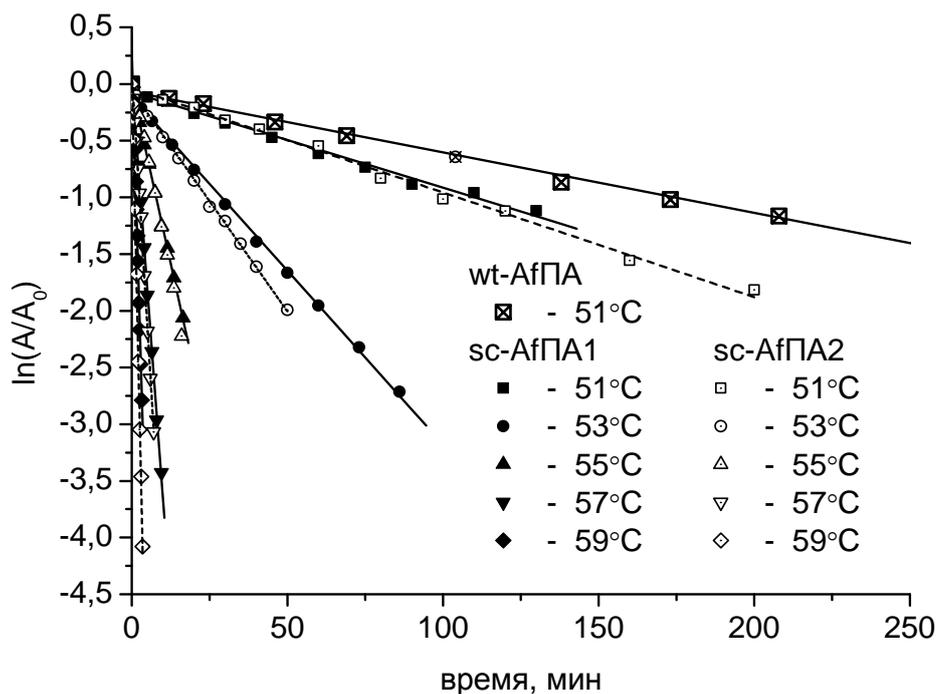


Рис. 4.40. Зависимость остаточной активности фермента от времени в полулогарифмических координатах (0,1 М KH_2PO_4 , pH 8,0).

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. 4.40). 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 $\ln(k_{\text{in}}/T)=f(1/T)$ (2), как показано на рис. 4.42.

$$k_{\text{in}} = \frac{k_{\text{B}}T}{h} \cdot \exp\left(-\frac{\Delta G^{\ddagger}}{RT}\right) = \frac{k_{\text{B}}T}{h} e^{\frac{\Delta S^{\ddagger}}{R} - \frac{\Delta H^{\ddagger}}{RT}} \quad (1)$$

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

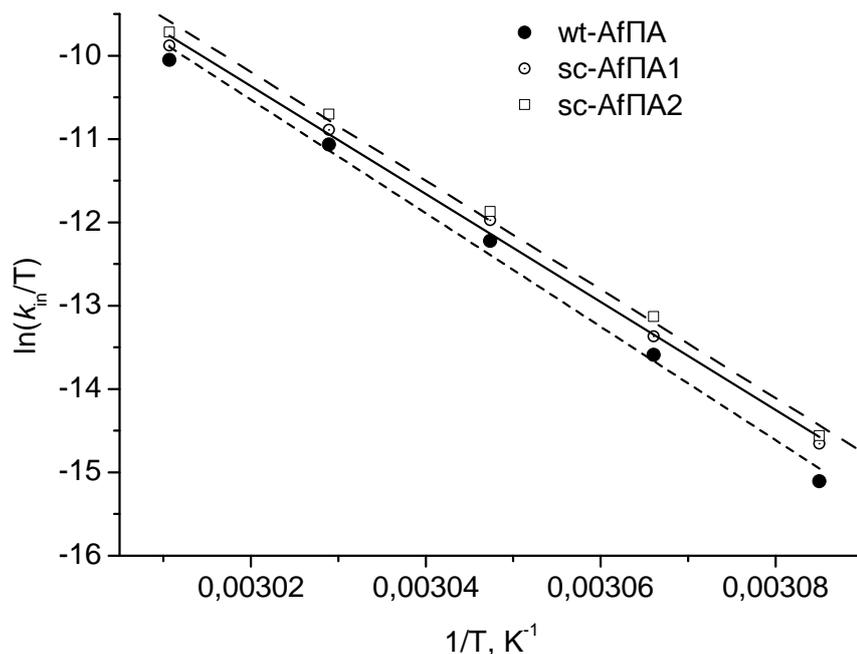


Рис. 4.41. Температурная зависимость констант скорости инактивации в координатах $\ln(k_{in}/T)$ - $1/T$.

Величины энтальпии ΔH^\ddagger и энтропии ΔS^\ddagger активации, рассчитанные из графика (рис. 4.41) с помощью теории ТАК, представлены в таблице 4.14. Эти значения одинаковы для sc-AfПА и wt-AfПА в пределах погрешности эксперимента и характерны для процесса денатурации фермента.

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 локальной конформационной подвижностью в области соединительной петли либо связана с отсутствием дисульфидной связи в молекуле одноцепочечной формы фермента.

Таблица 4.14.

Значения параметров активации.

Фермент	ΔH^\ddagger , кДж·моль ⁻¹	ΔS^\ddagger , Дж·моль ⁻¹ ·К ⁻¹
wt-AfПА	570±20	1420±70
sc-AfПА1	540±20	1340±60
sc-AfПА2	540±20	1350±60

Перспективы применения одноцепочечной AfПА ограничены трудоемким процессом получения чистого препарата, который требует затрат времени и ресурсов. С одной стороны, сокращение времени культивирования в три раза (20 ч, 20°C) сопровождается 10-кратным понижением итогового выхода по активности и добавляет еще одну, дополнительную стадию анионообменной хроматографии, если сравнивать с ферментом дикого типа (65 ч, 15°C). С другой стороны, было обнаружено, что при температуре культивирования 30°C всего за 3-4 часа культивирования уровень экспрессии одноцепочечного белка сопоставим с уровнем экспрессии для фермента дикого типа, по данным аналитического SDS-ПААГ электрофореза. Однако в данном случае возникает вопрос о рефолдинге белка из нерастворимых телец включения и дальнейшей разработке системы очистки, что требует дополнительных исследований.

V. ВЫВОДЫ

1. Показано, что аминокислотные замены в пенициллинацилазе G из *Alcaligenes faecalis* VKM В-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 $56,1 \pm 0,2$ °C при скорости сканирования 1 °C·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°C через 17-20 ч после индукции, в то время как для фермента дикого типа оптимальные время и температура культивирования составляют 65 часов и 15°C.

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

5. Изучение свойств полученных одноцепочечных sc-AfPA 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.

VI. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sakaguchi K., Murao S. A preliminary report on a new enzyme, "penicillin-amidase". // J. Agric. Chem. Soc. Jpn. 1950. V. 23. P. 411.
2. Claridge C.A., Gourevitch A., Lein J. Bacterial penicillin amidase. // Nature. 1960. V. 187. P. 237–238.
3. Erickson R.C., Bennett R.E. Penicillin acylase activity of *Penicillium chrysogenum*. // Appl. Microbiol. 1965. V. 13. № 5. P. 738–742.
4. Huang H.T., Seto T.A., Shull G.M. Distribution and substrate specificity of benzylpenicillin acylase. // Appl. Microbiol. 1963. V. 11. P. 1–6.
5. Szentirmai A. Production of penicillin acylase. // Appl. Microbiol. 1964. V. 12. P. 185–187.
6. English A.R., McBride T.J., Huang H.T. Microbial resistance to penicillin as related to penicillinase or penicillin acylase activity. // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1960. V. 104. P. 547–549.
7. Holt R.J., Stewart G.T. Production of amidase and beta-lactamase by bacteria. // J. Gen. Microbiol. 1964. V. 36. P. 203–213.
8. Chapman M.J., Holt R.J., Mattocks A.R., Stewart G.T. Differentiation of amidase and beta-lactamase by infrared absorption. // J. Gen. Microbiol. 1964. V. 36. P. 215–223.
9. Cole M. Formation of 6-aminopenicillanic acid, penicillins, and penicillin acylase by various fungi. // Appl. Microbiol. 1966. V. 14. № 1. P. 98–104.
10. Cole M., Sutherland R. The role of penicillin acylase in the resistance of gram-negative bacteria to penicillins. // J. Gen. Microbiol. 1966. V. 42. № 3. P. 345–356.
11. Vanderhaeghe H., Claesen M., Vlietinck A., Parmentier G. Specificity of penicillin acylase of *Fusarium* and of *Penicillium chrysogenum*. // Appl. Microbiol. 1968. V. 16. № 10. P. 1557–1563.
12. Cai G., Zhu S., Yang S., Zhao G., Jiang W. Cloning, overexpression, and characterization of a novel thermostable penicillin G acylase from *Achromobacter xylosoxidans*: probing the molecular basis for its high thermostability. // Appl. Environ. Microbiol. 2004. V. 70. № 5. P. 2764–2770.

13. Chiang C., Bennett R.E. Purification and properties of penicillin amidase from *Bacillus megaterium*. // J. Bacteriol. 1967. V. 93. № 1. P. 302–308.
14. Panbangred W., Weeradechapon K., Udomvaraphant S., Fujiyama K., Meevootisom V. High expression of the penicillin G acylase gene (*pac*) from *Bacillus megaterium* UN1 in its own *pac* minus mutant. // J. Appl. Microbiol. 2000. V. 89. № 1. P. 152–157.
15. Wang J., Zhang Q., Huang H., Yuan Z., Ding D., Yang S., Jiang W. Increasing synthetic performance of penicillin G acylase from *Bacillus megaterium* by site-directed mutagenesis. // Appl Microbiol Biotechnol. 2007. V. 74. № 5. P. 1023–1030.
16. Rajendhran J., Gunasekaran P. Molecular cloning and characterization of thermostable beta-lactam acylase with broad substrate specificity from *Bacillus badius*. // J. Biosci. Bioeng. 2007. V. 103. № 5. P. 457–463.
17. Kumar R.S., Suresh C.G., Pundle A., Prabhune A. Evidence for the involvement of arginyl residue at the active site of penicillin G acylase from *Kluyvera citrophila*. // Biotechnol. Lett. 2004. V. 26. № 20. P. 1601–1606.
18. Wen Y., Shi X., Yuan Z., Zhou P. Expression, purification, and characterization of His-tagged penicillin G acylase from *Kluyvera citrophila* in *Escherichia coli*. // Protein Expr. Purif. 2004. V. 38. № 1. P. 24–28.
19. Ohashi H., Katsuta Y., Hashizume T., Abe S.N., Kajiura H., Hattori H., Kamei T., Yano M. Molecular cloning of the penicillin G acylase gene from *Arthrobacter viscosus*. // Appl. Environ. Microbiol. 1988. V. 54. № 11. P. 2603–2607.
20. Ohashi H., Katsuta Y., Nagashima M., Kamei T., Yano M. Expression of the *Arthrobacter viscosus* penicillin G acylase gene in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. // Appl. Environ. Microbiol. 1989. V. 55. № 6. P. 1351–1356.
21. Konstantinović M., Marjanović N., Ljubijankić G., Glisin V. The penicillin amidase of *Arthrobacter viscosus* (ATCC 15294). // Gene. 1994. V. 143. № 1. P. 79–83.
22. Terreni M., Ubiali D., Bavaro T., Pregnolato M., Fernández-Lafuente R., Guisán J.M. Enzymatic synthesis of cephalosporins. The immobilized acylase from *Arthrobacter viscosus*: a new useful biocatalyst. // Appl Microbiol Biotechnol. 2007. V. 77. № 3. P. 579–587.

23. Robak M., Szewczuk A. Penicillin amidase from *Proteus rettgeri*. // Acta Biochim. Pol. 1981. V. 28. №3-4. P. 275–284.
24. Daumy G.O., McColl A.S., Apostolakos D. Repression of penicillin G acylase of *Proteus rettgeri* by tricarboxylic acid cycle intermediates. // J. Bacteriol. 1982. V. 152. № 1. P. 104–110.
25. Daumy G.O., Danley D., McColl A.S., Apostolakos D., Vinick F.J. Experimental evolution of penicillin G acylases from *Escherichia coli* and *Proteus rettgeri*. // J. Bacteriol. 1985. V. 163. № 3. P. 925–932.
26. Daumy GO, Danley D, McColl AS. Role of protein subunits in *Proteus rettgeri* penicillin G acylase. // J. Bacteriol. 1985. V. 163. № 3. P. 1279–1281.
27. Daumy G.O., Williams J.A., McColl A.S., Zuzel T.J., Danley D. Expression and regulation of the penicillin G acylase gene from *Proteus rettgeri* cloned in *Escherichia coli*. J Bacteriol. 1986. V. 168. № 1. P. 431–433.
28. Klei H.E., Daumy G.O., Kelly J.A. Purification and preliminary crystallographic studies of penicillin G acylase from *Providencia rettgeri*. // Protein Sci. 1995. V. 4. № 3. P. 433–441.
29. Zhou Z., Zhou L.P., Chen M.J., Zhang Y.L., Li R.B., Yang S., Yuan Z.Y. Purification and characterization of *Alcaligenes faecalis* penicillin G acylase expressed in *Bacillus subtilis*. // Acta Biochim. Biophys. Sinica. 2003. V. 35. № 5. P. 416–422.
30. Verhaert R.M., Riemens A.M., van der Laan J.M., van Duin J., Quax W.J. Molecular cloning and analysis of the gene encoding the thermostable penicillin G acylase from *Alcaligenes faecalis*. // Appl. Environ. Microbiol. 1997. V. 63. № 9. P. 3412–3418.
31. Ignatova Z., Stoeva S., Galunsky B., Hörnle C., Nurk A., Piotraschke E., Voelter W., Kasche V. Proteolytic processing of penicillin amidase from *Alcaligenes faecalis* cloned in *E. coli* yields several active forms. // Biotechnol. Lett. 1998. V. 20. № 10. P. 977–982.
32. Balci H., Ozturk M.T., Pijning T., Ozturk S.I., Gumusel F. Improved activity and pH stability of *E. coli* ATCC 11105 penicillin acylase by error-prone PCR. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2014. V. 98. № 10. P. 4467–4477.

33. Ljubijankić G., Gvozdenović J., Sevo M., Degrassi G. High-level secretory expression of penicillin amidase from *Providencia rettgeri* in *Saccharomyces cerevisiae*: purification and characterization. // *Biotechnol. Prog.* 2002. V. 18. № 2. P. 330–336.
34. Olsson A., Hagström T., Nilsson B., Uhlén M., Gatenbeck S. Molecular cloning of *Bacillus sphaericus* penicillin V amidase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. // *Appl. Environ. Microbiol.* 1985. V. 49. № 5. P. 1084–1089.
35. Torres-Bacete J., Hormigo D., Torres-Gúzman R., Arroyo M., Castellón M.P., García L., Acebal C., de la Mata I. Overexpression of penicillin V acylase from *Streptomyces lavendulae* and elucidation of its catalytic residues. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2015. V. 81. № 4. P. 1225–1233.
36. Hewitt L., Kasche V., Lummer K., Lewis R.J., Murshudov G.N., Verma C.S., Dodson G.G., Wilson K.S. Structure of a slow processing precursor penicillin acylase from *Escherichia coli* reveals the linker peptide blocking the active-site cleft. // *J. Mol. Biol.* 2000. V. 302. № 4. P. 887–898.
37. McDonough M.A., Klei H.E., Kelly J.A. Crystal structure of penicillin G acylase from the Bro1 mutant strain of *Providencia rettgeri*. // *Protein Sci.* 1999. V. 8. № 10. P. 1971–1981.
38. Varshney N.K., Kumar R.S., Ignatova Z., Prabhune A., Pundle A., Dodson E., Suresh C.G. Crystallization and X-ray structure analysis of a thermostable penicillin G acylase from *Alcaligenes faecalis*. // *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 2012. V. 68. № 3. P. 273–277.
39. Rojviriyaya C., Pratumrat T., Saper M.A., Yuvaniyama J. Improved X-ray diffraction from *Bacillus megaterium* penicillin G acylase crystals through long cryosoaking dehydration. // *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 2001. V. 67. № 12. P. 1570–1574.
40. Suresh C.G., Pundle A.V., SivaRaman H., Rao K.N., Brannigan J.A., McVey C.E., Verma C.S., Dauter Z., Dodson E.J., Dodson G.G. Penicillin V acylase crystal structure reveals new Ntn-hydrolase family members. // *Nat. Struct. Biol.* 1999. V. 6. № 5. P. 414–416.

41. Mukherji R., Varshney N.K., Panigrahi P., Suresh C.G., Prabhune A. A new role for penicillin acylases: degradation of acyl homoserine lactone quorum sensing signals by *Kluyvera citrophila* penicillin G acylase. // *Enzyme Microb. Technol.* 2014. V. 56. P. 1–7.
42. Bokhove M., Nadal Jimenez P., Quax W.J., Dijkstra B.W. The quorum-quenching N-acyl homoserine lactone acylase PvdQ is an Ntn-hydrolase with an unusual substrate-binding pocket. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2010. V. 107. № 2. P. 686–691.
43. Oh S.J., Kim Y.C., Park Y.W., Min S.Y., Kim I.S., Kang H.S. Complete nucleotide sequence of the penicillin G acylase gene and the flanking regions, and its expression in *Escherichia coli*. // *Gene.* 1987. V. 56. № 1. P. 87–97.
44. Ignatova Z., Wischnewski F., Notbohm H., Kasche V. Pro-sequence and Ca²⁺-binding: implications for folding and maturation of Ntn-hydrolase penicillin amidase from *E. coli*. // *J. Mol. Biol.* 2005. V. 348. № 4. P. 999–1014.
45. Barbero J.L., Buesa J.M., González de Buitrago G., Méndez E., Péz-Aranda A., García J.L. Complete nucleotide sequence of the penicillin acylase gene from *Kluyvera citrophila*. // *Gene.* 1986. V. 49. № 1. P. 69–80.
46. Zhiryakova D., Guncheva M., Ivanov I., Stambolieva N. Hydrolysis of phenylacetanilides catalyzed by penicillin G acylase from *Alcaligenes faecalis*: Sensitivity of the reaction to substitution in the leaving group. // *Catal. Commun.* 2009. V. 11. № 3. P. 196–201.
47. McVey C.E., Walsh M.A., Dodson G.G., Wilson K.S., Brannigan J.A. Crystal structures of penicillin acylase enzyme-substrate complexes: structural insights into the catalytic mechanism. // *J. Mol. Biol.* 2001. V. 313. № 1. P. 139–150.
48. Alkema W.B., Prins A.K., de Vries E., Janssen D.B. Role of alphaArg145 and betaArg263 in the active site of penicillin acylase of *Escherichia coli*. // *Biochem J.* 2002. V. 365. № 1. P. 303–309.
49. Svedas V., Guranda D., van Langen L., van Rantwijk F., Sheldon R. Kinetic study of penicillin acylase from *Alcaligenes faecalis*. // *FEBS Lett.* 1997. V. 417. № 3. P. 414–418.

50. Novikov F.N., Stroganov O.V., Khaliullin I.G., Panin N.V., Shapovalova I.V., Chilov G.G., Svedas V.K. Molecular modeling of different substrate-binding modes and their role in penicillin acylase catalysis. // FEBS J. 2013. V. 280. № 1. P. 115–126.
51. Böck A., Wirth R., Schmid G., Schumacher G., Lang G., Buckel P. The penicillin acylase from *Escherichia coli* ATCC11105 consists of two dissimilar subunits. // FEMS Microbiol. Lett. 1983.V. 20. № 2. P. 135–139.
52. Böck A., Wirth R., Schmid G., Schumacher G., Lang G., Buckel P. The two subunits of penicillin acylase are processed from a common precursor. // FEMS Microbiol. Lett. 1983. V. 20. № 2. P. 141–144.
53. Schumacher G., Sizmann D., Haug H., Buckel P., Böck A. Penicillin acylase from *E. coli*: unique gene-protein relation. // Nucleic Acids Res. 1986. V. 14. № 14. P. 5713–5727.
54. Sizmann D., Keilmann C., Böck A. Primary structure requirements for the maturation *in vivo* of penicillin acylase from *Escherichia coli* ATCC 11105. // Eur. J. Biochem. 1990. V. 192. № 1. P. 143–151.
55. Lindsay C.D., Pain R.H. The folding and solution conformation of penicillin G acylase. // Eur. J. Biochem. 1990. V. 192. № 1. P. 133–141.
56. Lindsay C.D., Pain R.H. Refolding and assembly of penicillin acylase, an enzyme composed of two polypeptide chains that result from proteolytic activation. // Biochemistry. 1991. V. 30. № 37. P. 9034–9040.
57. Burtscher H., Schumacher G. Reconstitution *in vivo* of penicillin G acylase activity from separately expressed subunits. // Eur. J. Biochem. 1992. V. 205. № 1. P. 77–83.
58. Xu Y., Weng C.L., Narayanan N., Hsieh M.Y., Anderson W.A., Scharer J.M., Moo-Young M., Chou C.P. Chaperone-mediated folding and maturation of the penicillin acylase precursor in the cytoplasm of *Escherichia coli*. // Appl. Environ. Microbiol. 2005. V. 71. № 10. P. 6247–6253.
59. Sriubolmas N., Panbangred W., Sriurairatana S., Meevootisom V. Localization and characterization of inclusion bodies in recombinant *Escherichia coli* cells overproducing penicillin G acylase. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1997. V. 47. № 4. P. 373–378.

60. Yang J., Kobayashi K., Iwasaki Y., Nakano H., Yamane T. In vitro analysis of roles of a disulfide bridge and a calcium binding site in activation of *Pseudomonas* sp. strain KWI-56 lipase. // J. Bacteriol. 2000. V. 182. № 2. P. 295–302.
61. Kasche V., Ignatova Z., Märkl H., Plate W., Punckt N., Schmidt D., Wiegandt K., Ernst B. Ca²⁺ is a cofactor required for membrane transport and maturation and is a yield-determining factor in high cell density penicillin amidase production. // Biotechnol. Prog. 2005. V. 21. № 2. P. 432–438.
62. Friehs K., Reardon K.F. Parameters influencing the productivity of recombinant *E. coli* cultivations. // Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 1993. V. 48. P. 53–77.
63. Boström M., Markland K. Sandén A.M., Hedhammar M., Hober S., Larsson G. Effect of substrate feed rate on recombinant protein secretion, degradation and inclusion body formation in *Escherichia coli*. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2005. V. 68. № 1. P. 82–90.
64. Narayanan N., Xu Y., Chou C.P. High-level gene expression for recombinant penicillin acylase production using the *araB* promoter system in *Escherichia coli*. // Biotechnol. Prog. 2006. V. 22. № 6. P. 1518–1523.
65. Narayanan N., Hsieh M.Y., Xu Y., Chou C.P. Arabinose-induction of lac-derived promoter systems for penicillin acylase production in *Escherichia coli*. // Biotechnol. Prog. 2006. V. 22. № 3. P. 617–625.
66. Nishihara K., Kanemori M., Yanagi H., Yura T. Overexpression of trigger factor prevents aggregation of recombinant proteins in *Escherichia coli*. // Appl. Environ. Microbiol. 2000. V. 66. № 3. P. 884–889.
67. Chou C.P., Tseng J.H., Kuo B.Y., Lai K.M., Lin M.I., Lin H.K. Effect of SecB chaperone on production of periplasmic penicillin acylase in *Escherichia coli*. // Biotechnol. Prog. 1999. V. 15. № 3. P. 439–445.
68. Pan K.L., Hsiao H.C., Weng C.L., Wu M.S., Chou C.P. Roles of DegP in prevention of protein misfolding in the periplasm upon overexpression of penicillin acylase in *Escherichia coli*. // J. Bacteriol. 2003. V. 185. № 10. P. 3020–3030.
69. Udgaonkar J.B. Polypeptide chain collapse and protein folding. // Arch. Biochem. Biophys. 2013. V. 531. № 1-2. P. 24–33.

70. Brunori M., Gianni S., Giri R., Morrone A., Travaglini-Allocatelli C. Morphogenesis of a protein: folding pathways and the energy landscape. // *Biochem. Soc. Trans.* 2012. V. 40. № 2. P. 429–432.
71. Eiberle M.K., Jungbauer A. Technical refolding of proteins: Do we have freedom to operate? // *Biotechnol. J.* 2010. V. 5. № 6. P. 547–559.
72. Tsumoto K., Ejima D., Kumagai I., Arakawa T. Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. // *Protein Expr. Purif.* 2003. V. 28. № 1. P. 1–8.
73. Hamada H., Arakawa T., Shiraki K. Effect of additives on protein aggregation. // *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2009. V. 10. № 4. P. 400–407.
74. Vuillard L., Rabilloud T., Goldberg M.E. Interactions of non-detergent sulfobetaines with early folding intermediates facilitate in vitro protein renaturation. // *Eur. J. Biochem.* 1998. V. 256. № 1. P. 128–135.
75. Grinberg V.Y., Burova T.V., Grinberg N.V., Shcherbakova T.A., Guranda D.T., Chilov G.G., Svedas V.K. Thermodynamic and kinetic stability of penicillin acylase from *Escherichia coli*. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2008. V. 1784. № 5. P. 736–746.
76. Whitehead T.A., Bergeron L.M., Clark D.S. Tying up the loose ends: circular permutation decreases the proteolytic susceptibility of recombinant proteins. // *Protein Eng. Des. Sel.* 2009. V. 22. № 10. P. 607–613.
77. Reitinger S., Yu Y., Wicki J., Ludwiczek M., D'Angelo I., Baturin S., Okon M., Strynadka N.C., Lutz S., Withers S.G., McIntosh L.P. Circular permutation of *Bacillus circulans* xylanase: a kinetic and structural study. // *Biochemistry.* 2010. V. 49. № 11. P. 2464–2474.
78. Mizobata T., Uemura T., Isaji K., Hirayama T., Hongo K., Kawata Y. Probing the functional mechanism of *Escherichia coli* GroEL using circular permutation. // *PLoS One.* 2011. V. 6. № 10. e26462.
79. Li W., Cantor J.R., Yogesha S.D., Yang S., Chantranupong L., Liu J.Q., Agnello G., Georgiou G., Stone E.M., Zhang Y. Uncoupling intramolecular processing and substrate hydrolysis in the N-terminal nucleophile hydrolase hASRGL1 by circular permutation. // *ACS Chem. Biol.* 2012. V. 7. № 11. P. 1840–1847.

80. Schierling B., Wende W., Pingoud A. Redesigning the single-chain variant of the restriction endonuclease *PvuII* by circular permutation. // *FEBS Lett.* 2012. V. 586. № 12. P. 1736–1741.
81. Le Trong I., Chu V., Xing Y., Lybrand T.P., Stayton P.S., Stenkamp R.E. Structural consequences of cutting a binding loop: two circularly permuted variants of streptavidin. // *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* 2013. V. 69. № 6. P. 968–977.
82. Hultqvist G., Punekar A.S., Morrone A., Chi C.N., Engström A., Selmer M., Gianni S., Jemth P. Tolerance of protein folding to a circular permutation in a PDZ domain. // *PLoS One.* 2012. V. 7. № 11. e50055.
83. Haglund E., Lind J., Oman T., Ohman A., Måler L., Oliveberg M. The HD-exchange motions of ribosomal protein S6 are insensitive to reversal of the protein-folding pathway. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2009. V. 106. № 51. P. 21619–21624.
84. Butler J.S., Mitrea D.M., Mitrousis G., Cingolani G., Loh S.N. Structural and thermodynamic analysis of a conformationally strained circular permutant of barnase. // *Biochemistry.* 2009. V. 48. № 15. P. 3497–3507.
85. Kojima M., Ayabe K., Ueda H. Importance of terminal residues on circularly permuted *Escherichia coli* alkaline phosphatase with high specific activity. // *J. Biosci. Bioeng.* 2005. V. 100. № 2. P. 197–202.
86. Flores G., Soberón X., Osuna J. Production of a fully functional, permuted single-chain penicillin G acylase. // *Protein Sci.* 2004. V. 13. № 6. P. 1677–1683.
87. Smith V.F., Matthews C.R. Testing the role of chain connectivity on the stability and structure of dihydrofolate reductase from *E. coli*: fragment complementation and circular permutation reveal stable, alternatively folded forms. // *Protein Sci.* 2001. V. 10. № 1. P. 116–128.
88. Osuna J., Pérez-Blancas A., Soberón X. Improving a circularly permuted TEM-1 beta-lactamase by directed evolution. // *Protein Eng.* 2002. V. 15. № 6. P. 463–470.
89. Schwartz T.U., Walczak R., Blobel G. Circular permutation as a tool to reduce surface entropy triggers crystallization of the signal recognition particle receptor beta subunit. // *Protein Sci.* 2004. V. 13. № 10. P. 2814–2818.

90. Trummal K., Aaspõllu A., Tõnismägi K., Samel M., Subbi J., Siigur J., Siigur E. Phosphodiesterase from *Vipera lebetina* venom - structure and characterization. // *Biochimie*. 2014. V. 106. P. 48–55.
91. Setlur S.R., Dighe R.R. Single chain human chorionic gonadotropin, hCG α : effects of mutations in the alpha subunit on structure and bioactivity. // *Glycoconj. J.* 2007. V. 24. № 1. P. 97–106.
92. Legardinier S., Poirier J.C., Klett D., Combarous Y., Cahoreau C. Stability and biological activities of heterodimeric and single-chain equine LH/chorionic gonadotropin variants. // *J. Mol. Endocrinol.* 2008. V. 40. № 4. P. 185–198.
93. Fralish G.B., Narayan P., Puett D. Consequences of single-chain translation on the structures of two chorionic gonadotropin yoked analogs in alpha-beta and beta-alpha configurations. // *Mol. Endocrinol.* 2003. V. 17. № 4. P. 757–767.
94. Kurg R., Tekkel H., Abroi A., Ustav M. Characterization of the functional activities of the bovine papillomavirus type 1 E2 protein single-chain heterodimers. // *J. Virol.* 2006. V. 80. № 22. P. 11218–11225.
95. Aslan F.M., Yu Y., Mohr S.C., Cantor C.R. Engineered single-chain dimeric streptavidins with an unexpected strong preference for biotin-4-fluorescein. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2005. V. 102. № 24. P. 8507–8512.
96. Tabtiang R.K., Cezairliyan B.O., Grant R.A., Cochrane J.C., Sauer R.T. Consolidating critical binding determinants by noncyclic rearrangement of protein secondary structure. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2005. V. 102. № 7. P. 2305–2309.
97. Jäger M., Plückthun A. Domain interactions in antibody Fv and scFv fragments: effects on unfolding kinetics and equilibria. // *FEBS Lett.* 1999. V. 462. № 3. P. 307–312.
98. Weisser N.E., Hall J.C. Applications of single-chain variable fragment antibodies in therapeutics and diagnostics. // *Biotechnol. Adv.* 2009. V. 27. № 4. P. 502–520.
99. Torres L.L., Cantero A., del Valle M., Marina A., López-Gallego F., Guisán J.M., Berenguer J., Hidalgo A. Engineering the substrate specificity of a thermophilic penicillin acylase from *Thermus thermophilus*. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2013. V. 79. № 5. P. 1555–1562.

100. Guranda D.T., Volovik T.S., Svedas V.K. pH Stability of penicillin acylase from *Escherichia coli*. // Biochemistry (Mosc). 2004. V. 69. № 12. P. 1386–1390.
101. Merlino A., Russo Krauss I., Castellano I., Ruocco M.R., Capasso A., De Vendittis E., Rossi B., Sica F. Structural and denaturation studies of two mutants of a cold adapted superoxide dismutase point to the importance of electrostatic interactions in protein stability. // Biochim. Biophys. Acta. 2014. V. 1844. № 3. P. 632–640.
102. Torres L.L., Ferreras E.R., Cantero A., Hidalgo A., Berenguer J. Functional expression of a penicillin acylase from the extreme thermophile *Thermus thermophilus* HB27 in *Escherichia coli*. // Microb. Cell. Fact. 2012. V. 11. № 105.
103. Panigrahi P., Chand D., Mukherji R., Ramasamy S., Suresh C.G. Sequence and structure-based comparative analysis to assess, identify and improve the thermostability of penicillin G acylases. // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2015. V. 42. № 11. P. 1493–1506.
104. Schwaighofer A., Kotlowski C., Araman C., Chu N., Mastrogiacomo R., Becker C., Pelosi P., Knoll W., Larisika M., Nowak C. Honey bee odorant-binding protein 14: effects on thermal stability upon odorant binding revealed by FT-IR spectroscopy and CD measurements. // Eur. Biophys. J. 2014. V. 43. № 2-3. P. 105–112.
105. Suplatov D., Panin N., Kirilin E., Shcherbakova T., Kudryavtsev P., Svedas V. Computational design of a pH stable enzyme: understanding molecular mechanism of penicillin acylase's adaptation to alkaline conditions. // PLoS One. 2014.V. 9. № 6. e100643.
106. Dai M., Zhu Y., Yang Y., Wang E., Xie Y., Zhao G., Jiang W. Expression of penicillin G acylase from the cloned *pac* gene of *Escherichia coli* ATCC11105. Effects of *pacR* and temperature. // Eur. J. Biochem. 2001. V. 268. № 5. P. 1298-1303.
107. Vohra P.K., Sharma R., Kashyap D.R., Tewari R. Enhanced production of penicillin G acylase from a recombinant *Escherichia coli*. // Biotechnol. Lett. 2001. V. 23. P. 531–535.
108. Huang S.W., Lin Y.H., Chin H.L., Wang W.C., Kuo B.Y., Chou C.P. Effect of pH on high-temperature production of bacterial penicillin acylase in *Escherichia coli*. // Biotechnol. Prog. 2002. V. 18. № 3. P. 668–671.

109. Deak P.M., Lutz-Wahl S., Bothe H., Fischer L. Bioreactor cultivation of *Escherichia coli* for production of recombinant penicillin G amidase from *Alcaligenes faecalis*. // Biotechnol. Lett. 2003. V. 25. № 5. P. 397–400.
110. Xu Y., Rosenkranz S., Weng C.L., Scharer J.M., Moo-Young M., Chou C.P. Characterization of the *T7* promoter system for expressing penicillin acylase in *Escherichia coli*. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2006. V. 72. № 3. P. 529–536.
111. Wu M.S., Pan K.L., Chou C.P. Effect of heat-shock proteins for relieving physiological stress and enhancing the production of penicillin acylase in *Escherichia coli*. // Biotechnol. Bioeng. 2007. V. 96. № 5. P. 956–966.
112. Orr V., Scharer J., Moo-Young M., Honeyman C.H., Fenner D., Crossley L., Suen S.Y., Chou C.P. Integrated development of an effective bioprocess for extracellular production of penicillin G acylase in *Escherichia coli* and its subsequent one-step purification. // J. Biotechnol. 2012. V. 161. № 1. P. 19–26.
113. Orr V., Scharer J., Moo-Young M., Honeyman C.H., Fenner D., Crossley L., Suen S.Y., Chou C.P. Simultaneous clarification of *Escherichia coli* culture and purification of extracellularly produced penicillin G acylase using tangential flow filtration and anion-exchange membrane chromatography (TFF-AEMC). // J. Chromatogr. B: Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 2012. V. 900. P. 71–78.
114. Vélez A.M., da Silva A.J., Luperni Horta A.C., Sargo C.R., Campani G., Gonçalves Silva G., de Lima Camargo Giordano R., Zangirolami T.C. High-throughput strategies for penicillin G acylase production in *rE. coli* fed-batch cultivations. // BMC Biotechnol. 2014. V. 14. № 6.
115. Illanes A., Torres R., Cartagena O., Ruiz A. Evaluation of penicillin acylase production by two strains of *Bacillus megaterium*. // Biol. Res. 1993. V. 26. № 3. P. 357–364.
116. Illanes A., Acevedo F., Gentina J.C., Torres R., Cartagena O., Ruiz A., Viisquez M. Production of penicillin acylase from *Bacillus megaterium* in complex and defined media. // Process Biochem. 1994. V. 29. P. 263–270.

117. Gentina G.C., Acevedo F., Villagra M.P. Short communication: effect of complex nitrogen sources on the production of penicillin acylase by *Bacillus megaterium*. // W. J. Microbiol. Biotechnol. 1997. V. 13. P. 127–128.
118. Pinotti L.M., Silva A.F., Silva R.G., Giordano R.L. Study of different media for production of penicillin G acylase from *Bacillus megaterium* ATCC 14945. // Appl. Biochem. Biotechnol. 2000. V. 84-86. № 1-9. P. 655–663.
119. Yang Y., Biedendieck R., Wang W., Gamer M., Malten M., Jahn D., Deckwer W.D. High yield recombinant penicillin G amidase production and export into the growth medium using *Bacillus megaterium*. // Microb. Cell Fact. 2006. V. 5. № 36.
120. Pinotti L.M., Ribeiro de Souza V., de Campos Giordano R., de Lima Camargo Giordano R. The penicillin G acylase production by *B. megaterium* is amino acid consumption dependent. // Biotechnol. Bioeng. 2007. V. 97. № 2. P. 346–353.
121. Sevo M., Degrassi G., Skoko N., Venturi V., Ljubijankić G. Production of glycosylated thermostable *Providencia rettgeri* penicillin G amidase in *Pichia pastoris*. // FEMS Yeast Res. 2002. V. 1. № 4. P. 271–277.
122. Kasche V., Galunsky B., Ignatova Z. Fragments of pro-peptide activate mature penicillin amidase of *Alcaligenes faecalis*. // Eur. J. Biochem. 2003. V. 270. № 23. P. 4721–4728.
123. Ignatova Z., Mahsunah A., Georgieva M., Kasche V. Improvement of posttranslational bottlenecks in the production of penicillin amidase in recombinant *Escherichia coli* strains. // Appl. Environ. Microbiol. 2003. V. 69. № 2. P. 1237–1245.
124. Xu Y., Hsieh M.Y., Narayanan N., Anderson W.A., Scharer J.M., Moo-Young M., Chou C.P. Cytoplasmic overexpression, folding, and processing of penicillin acylase precursor in *Escherichia coli*. // Biotechnol. Prog. 2005. V. 21. № 5. P. 1357–1365.
125. Zhang M., Shi M., Zhou Z., Yang S., Yuan Z., Ye Q. Production of *Alcaligenes faecalis* penicillin G acylase in *Bacillus subtilis* WB600 (pMA5) fed with partially hydrolyzed starch. // Enzyme Microb. Technol. 2006. V. 39. № 4. P. 555–560.
126. Cheng T., Chen M., Zheng H., Wang J., Yang S., Jiang W. Expression and purification of penicillin G acylase enzymes from four different micro-organisms, and a

comparative evaluation of their synthesis/hydrolysis ratios for cephalixin. // *Protein Expr. Purif.* 2006. V. 46. № 1. P. 107–113.

127. Wang T., Zhu H., Ma X., Ma Y., Wei D. Structure-based stabilization of an enzyme: the case of penicillin acylase from *Alcaligenes faecalis*. // *Protein Pept. Lett.* 2006. V. 13. № 2. P. 177–183.

128. Wang T., Zhu H., Ma X., Fei Z., Ma Y., Wei D. Enhancing enzymatic activity of penicillin G acylase by coexpressing *pcm* gene. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2006. V. 72. № 5. P. 953–958.

129. Jiang Y.M., Tong W.Y., Wei D.Z. Effects of induction starting time and Ca^{2+} on expression of active penicillin G acylase in *Escherichia coli*. // *Biotechnol. Prog.* 2007. V. 23. № 5. P. 1031–1037.

130. Bečka S., Štěpánek V., Vyasarayani R.W., Grulich M., Maršálek J., Plháčková K., Dobišová M., Marešová H., Plačková M., Valešová R., Palyzová A., Datla A., Ashar T.K., Kyslík P. Penicillin G acylase from *Achromobacter* sp. CCM 4824: an efficient biocatalyst for syntheses of beta-lactam antibiotics under conditions employed in large-scale processes. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2014. V. 98. № 3. P. 1195–1203.

131. Rajendhran J., Krishnakumar V., Gunasekaran P. Production of penicillin G acylase from *Bacillus* sp.: effect of medium components. // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2003. V. 19. P. 107–110.

132. Rajendhran J., Krishnakumar V., Gunasekaran P. Optimization of a fermentation medium for the production of Penicillin G acylase from *Bacillus* sp. // *Lett. Appl. Microbiol.* 2002. V. 35. № 6. P. 523–527.

133. Chou C.P., Wang W.C., Lin M.I. An approach for enhancing heterologous production of *Providencia rettgeri* penicillin acylase in *Escherichia coli*. // *Biotechnol. Prog.* 2000. V. 16. № 3. P. 315–318.

134. Rodriguez M., Güereca L., Valle F., Quintero R., López-Munguia A. Penicillin acylase extraction by osmotic shock. // *Process Biochem.* 1992. V. 27. № 4. P. 217–223.

135. Das S., Gayen J.R., Pal A., Ghosh K., Rosazza J.P., Samanta T.B. Purification, substrate specificity, and N-terminal amino acid sequence analysis of a beta-lactamase-

- free penicillin amidase from *Alcaligenes* sp. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2004. V. 65. № 3. P. 281–286.
136. Deng S., Su E., Ma X., Yang S., Wei D. Efficient enzymatic synthesis of ampicillin by mutant *Alcaligenes faecalis* penicillin G acylase. // J. Biotechnol. 2015. V. 199. P. 62–68.
137. Senthilvel S.G., Pai J.S. Purification of penicillin acylase of *Bacillus megaterium*. // Biotechnol. Tech. 1996. V. 10. № 8. P. 611–614.
138. Liu Y.C., ChangChien C.C., Suen S.Y. Purification of penicillin G acylase using immobilized metal affinity membranes. // J. Chromatogr. B: Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 2003. V. 794. № 1. P. 67–76.
139. Aguilar O., Albiter V., Serrano-Carreón L., Rito-Palomares M. Direct comparison between ion-exchange chromatography and aqueous two-phase processes for the partial purification of penicillin acylase produced by *E. coli*. // J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 2006. V. 835. № 1-2. P. 77–83.
140. Fuentes M., Batalla P., Grazu V., Pessela B.C., Mateo C., Montes T., Hermoso J.A., Guisan J.M., Fernandez-Lafuente R. Mixed ion exchange supports as useful ion exchangers for protein purification: purification of penicillin G acylase from *Escherichia coli*. // Biomacromolecules. 2007. V. 8. № 2. P. 703–707.
141. Coulon D., Cabanne C., Fitton V., Noubhani A.M., Saint-Christophe E., Santarelli X. Penicillin acylase purification with the aid of hydrophobic charge induction chromatography. // J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 2004. V. 808. № 1. P. 111–115.
142. Fonseca L.J., Patricio I.M., Cabral J.M. Preliminary studies on continuous recovery and purification of the penicillin acylase under pseudo-affinity conditions using phenyl-Sepharose gel. // J. Mol. Recognit. 1998. V. 11. № 1-6. P. 252–254.
143. Mahajan P.B., Borkar P.S. Novel approaches to the purification of penicillin acylase. // Appl. Biochem. Biotechnol. 1984. V. 9. № 5-6. P. 421–437.
144. Kasche V., Haufler U., Markowsky D., Melnyk S., Zeich A., Galunsky B. Penicillin amidase from *E. coli*. Enzyme heterogeneity and stability. // Ann. N. Y. Acad. Sci. 1987. V. 501. P. 97–102.

145. Pundle A., SivaRaman H. *Bacillus sphaericus* penicillin V acylase: purification, substrate specificity, and active-site characterization. // *Curr. Microbiol.* 1997. V. 34. № 3. P. 144–148.
146. Keçili R., Say R., Yavuz H. Synthesis and characterization of pseudo-affinity ligand for penicillin acylase purification. // *Int. J. Biol. Macromol.* 2006. V. 39. № 4-5. P. 250–255.
147. Janssen M.H., van Langen L.M., Pereira S.R., van Rantwijk F., Sheldon R.A. Evaluation of the performance of immobilized penicillin G acylase using active-site titration. // *Biotechnol. Bioeng.* 2002. V. 78. № 4. P. 425–432.
148. Senerovic L., Stankovic N., Spizzo P., Basso A., Gardossi L., Vasiljevic B., Ljubijankic G., Tisminetzky S., Degrassi G. High-level production and covalent immobilization of *Providencia rettgeri* penicillin G acylase (PAC) from recombinant *Pichia pastoris* for the development of a novel and stable biocatalyst of industrial applicability. // *Biotechnol. Bioeng.* 2006. V. 93. № 2. P. 344–354.
149. Adikane H.V., Singh R.K., Thakar D.M., Nene S.N. Single-Step purification and immobilization of penicillin acylase using hydrophobic ligands. // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2001. V. 94. № 2. P. 127–134.
150. Katchalski-Katzir E., Kraemer D.M. Eupergit® C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential. // *J. Mol. Catal. B Enzym.* 2000. V. 10. № 1-3. P. 157–176.
151. Scaramozzino F., Estruch I., Rossolillo P., Terreni M., Albertini A.M. Improvement of catalytic properties of *Escherichia coli* penicillin G acylase immobilized on glyoxyl agarose by addition of a six-amino-acid tag. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2005. V. 71. № 12. P. 8937–8940.
152. Van Langen L.M., Janssen M.H., Oosthoek N.H., Pereira S.R., Svedas V.K., van Rantwijk F., Sheldon R.A. Active site titration as a tool for the evaluation of immobilization procedures of penicillin acylase. // *Biotechnol. Bioeng.* 2002. V. 79. № 2. P. 224–228.
153. Serra I., Ubiali D., Cecchini D.A., Calleri E., Albertini A.M., Terreni M., Temporini C. Assessment of immobilized PGA orientation via the LC-MS analysis of tryptic digests

- of the wild type and its 3K-PGA mutant assists in the rational design of a high-performance biocatalyst. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2013. V. 405. № 2-3. P. 745–753.
154. Adriano W.S., Filho E.H., Silva J.A., Gonçalves L.R. Optimization of penicillin G acylase multipoint immobilization on to glutaraldehyde-chitosan beads. // *Biotechnol. Appl. Biochem.* 2005. V. 41. № 3. P. 201–207.
155. Cheng S., Wei D., Song Q., Zhao X. Immobilization of permeabilized whole cell penicillin G acylase from *Alcaligenes faecalis* using pore matrix crosslinked with glutaraldehyde. // *Biotechnol. Lett.* 2006. V. 28. № 14. P. 1129–1133.
156. Wang A., Wang H., Zhu S., Zhou C., Du Z., Shen S. An efficient immobilizing technique of penicillin acylase with combining mesocellular silica foams support and p-benzoquinone cross linker. // *Bioprocess Biosyst. Eng.* 2008. V. 31. № 5. P. 509–517.
157. Zhao J., Wang Y., Luo G., Zhu S. Covalent immobilization of penicillin G acylase on aminopropyl-functionalized mesostructured cellular foams. // *Bioresour. Technol.* 2010. V. 101. № 19. P. 7211–7217.
158. Bernardino S.M., Fernandes P., Fonseca L.P. A new biocatalyst: Penicillin G acylase immobilized in sol-gel micro-particles with magnetic properties. // *Biotechnol. J.* 2009. V. 4. № 5. P. 695–702.
159. Deng S., Ma X., Su E., Wei D. Efficient cascade synthesis of ampicillin from penicillin G potassium salt using wild and mutant penicillin G acylase from *Alcaligenes faecalis*. // *J. Biotechnol.* 2016. V. 219. P. 142–148.
160. Deng S., Ma X., Sun M., Wei D., Su E. Efficient enzymatic synthesis of ampicillin using mutant Penicillin G acylase with bio-based solvent glycerol. // *Catal. Commun.* 2016. V. 79. P. 31–34.
161. Blum J.K., Deaguero A.L., Perez C.V., Bommarius A.S. Ampicillin Synthesis Using a Two-Enzyme Cascade with Both α -Amino Ester Hydrolase and Penicillin G Acylase. // *ChemCatChem.* 2010. V. 2. № 8. P. 987–991.
162. Ling X.M., Wang X.Y., Ma P., Yang Y., Qin J.M., Zhang X.J., Zhang Y.W. Covalent Immobilization of Penicillin G Acylase onto Fe₃O₄@Chitosan Magnetic Nanoparticles. // *J. Microbiol. Biotechnol.* 2016. V. 26. № 5. P. 829–836.

163. Zhang Y.W., Liu R.J., Xu X.M. One-pot, two-step enzymatic synthesis of amoxicillin by complexing with Zn^{2+} . // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2010. V. 88. № 1. P. 49–55.
164. Wu Q., Chen C.X., Du L.L., Lin X.F. Enzymatic synthesis of amoxicillin via a one-pot enzymatic hydrolysis and condensation cascade process in the presence of organic co-solvents. // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2010. V. 160. № 7. P. 2026–2035.
165. Cecchini D.A., Pavesi R., Sanna S., Daly S., Xaiz R., Pregnolato M., Terreni M. Efficient biocatalyst for large-scale synthesis of cephalosporins, obtained by combining immobilization and site-directed mutagenesis of penicillin acylase. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2012. V. 95. № 6. P. 1491–500.
166. Bernardino S.M., Fernandes P., Fonseca L.P. Improved specific productivity in cephalexin synthesis by immobilized PGA in silica magnetic micro-particles. // *Biotechnol. Bioeng.* 2010. V. 107. № 5. P. 753–762.
167. Massolini G., Temporini C., Calleri E. Penicillin G acylase as chiral selector in LC and CE: exploring the origins of enantioselectivity. // *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2008. V. 875. № 1. P. 20–29.
168. Abian O., Mateo C., Palomo J.M., Fernández-Lorente G., Guisán J.M., Fernández-Lafuente R. Enantioselective synthesis of phenylacetamides in the presence of high organic cosolvent concentrations catalyzed by stabilized penicillin G acylase. Effect of the acyl donor. // *Biotechnol. Prog.* 2004. V. 20. № 3. P. 984–988.
169. Massolini G., Calleri E., De Lorenzi E., Pregnolato M., Terreni M., Félix G., Gandini C. Immobilized penicillin G acylase as reactor and chiral selector in liquid chromatography. // *J. Chromatogr. A.* 2001. V. 921. № 2. P. 147–160.
170. Gotti R., Fiori J., Calleri E., Temporini C., Lubda D., Massolini G. Chiral capillary liquid chromatography based on penicillin G acylase immobilized on monolithic epoxy silica column. // *J. Chromatogr. A.* 2012. V. 1234. P. 45–49.
171. Li D., Ji L., Wang X., Wei D. Enantioselective acylation of β -phenylalanine acid and its derivatives catalyzed by penicillin G acylase from *Alcaligenes faecalis*. // *Prep. Biochem. Biotechnol.* 2013. V. 43. № 2. P. 207–216.

172. Deaguero A.L., Blum J.K., Bommarius A.S. Improving the diastereoselectivity of penicillin G acylase for ampicillin synthesis from racemic substrates. // *Protein Eng. Des. Sel.* 2012. V. 25. № 3. P. 135–144.
173. Khimiuk A.Y., Korennykh A.V., van Langen L.M., van Rantwijk F., Sheldon R.A., Švedas V.K. Penicillin acylase-catalyzed peptide synthesis in aqueous medium: a chemo-enzymatic route to stereoisomerically pure diketopiperazines. // *Tetrahedron Asymmetry.* 2003. V. 14. P. 3123–3128.
174. Góngora-Benítez M., Basso A., Bruckdorfer T., Royo M., Tulla-Puche J., Albericio F. Eco-friendly combination of the immobilized PGA enzyme and the S-Phacm protecting group for the synthesis of Cys-containing peptides. // *Chemistry.* 2012. V. 18. № 50. P. 16166–16176.
175. Shcherbakova T.A., Panin N.V., Suplatov D.A., Shapovalova I.V., Švedas V.K. The β D484N mutant of penicillin acylase from *Escherichia coli* is moreresistant to inactivation by substrates and can effectively perform peptide synthesis in aqueous medium. // *J. Mol. Catal. B Enzym.* 2015. V. 112. P. 66–68.
176. Panin N., Suplatov D., Kirilin E., Shcherbakova T., Kudravnsev P., Švedas V. Bioinformatic analysis and molecular modeling reveal mutation bD484N to stabilize penicillin acylase and improve its catalytic performance in alkaline medium. // *FEBS Lett.* 2013. V. 280. № 1. P. 614.
177. Suplatov D., Shalaeva D., Kirilin E., Arzhanik V., Švedas V. Bioinformatic analysis of protein families for identification of variable amino acid residues responsible for functional diversity. // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2014. V. 32. № 1. P. 75–87.
178. Sloniec J., Resch-Genger U., Hennig A. Photophysics and release kinetics of enzyme-activatable optical probes based on H-dimerized fluorophores on self-immolative linkers. // *J. Phys. Chem. B.* 2013. V. 117. № 46. P. 14336–14344.
179. Redy O., Shabat D. Modular theranostic prodrug based on a FRET-activated self-immolative linker. // *J. Control. Release.* 2012. V. 164. № 3. P. 276–282.
180. Langowska K, Palivan CG, Meier W. Polymer nanoreactors shown to produce and release antibiotics locally. // *Chem. Commun. (Camb.).* 2012. V. 49. № 2. P. 128–130.

181. Li Y., Liu G., Wang X., Hu J., Liu S. Enzyme-Responsive Polymeric Vesicles for Bacterial-Strain-Selective Delivery of Antimicrobial Agents. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2016. V. 55. № 5. P. 1760-1764.
182. Sitnikov N.S., Li Y., Zhang D., Yard B., Schmalz H.G. Design, synthesis, and functional evaluation of CO-releasing molecules triggered by Penicillin G amidase as a model protease. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2015. V. 54. № 42. P. 12314–12318.
183. Zhang Y.W., Wei D.Z. Enzymatic preparation of cefaclor with immobilized penicillin acylase. // *Prep. Biochem. Biotechnol.* 2008. V. 38. № 2. P. 129–138.
184. Brannigan J.A., Dodson G., Duggleby H.J., Moody P.C., Smith J.L., Tomchick D.R., Murzin A.G. A protein catalytic framework with an N-terminal nucleophile is capable of self-activation. // *Nature.* 1995. V. 378. № 6555. P. 416–419.
185. Li D., Cheng S., Wei D., Ren Y., Zhang D. Production of enantiomerically pure (S)-beta-phenylalanine and (R)-beta-phenylalanine by penicillin G acylase from *Escherichia coli* in aqueous medium. // *Biotechnol. Lett.* 2007. V. 29. № 12. P. 1825–1830.
186. Ясная А.С. Клонирование и экспрессия в *E.coli* пенициллинацилаз для получения мутантных форм с улучшенными свойствами: дис. канд. хим. наук: 03.00.23, 02.00.15. – Москва, 2009. – 140 с.
187. Alkema W.B., Hensgens C.M., Kroezinga E.H., de Vries E., Floris R., van der Laan J.M., Dijkstra B.W., Janssen D.B. Characterization of the beta-lactam binding site of penicillin acylase of *Escherichia coli* by structural and site-directed mutagenesis studies. // *Protein Eng.* 2000. V. 13. № 12. P. 857–863.
188. Svedas V.K., Margolin A.L., Sherstyuk S.F., Klyosov A.A., Berezin I.V. Inactivation of soluble and immobilized penicillin amidase from *E.coli* by phenylmethylsulfonyl fluoride: the kinetic analysis and titration of the enzyme active sites. // *Bioorg. Khim.* 1977. V. 3. № 4. P. 546–553.
189. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. // *Nature.* 1970. V. 227. № 5259. P. 680–685.
190. Garcia J.L., Busea J.M. An improved method to clone penicillin acylase genes: Cloning and expression in *Escherichia coli* of penicillin G acylase from *Kluyvera citrophila*. // *J. Biotechnol.* 1986. V. 3. P. 187–195.

191. Mayer H., Collins J., Wagner F. Cloning of the penicillin G acylase gene of *Escherichia coli* ATCC 11105 on multicopy plasmids. In K. N. Timmis and A. Puhler (ed.), Plasmids of medical, environmental and commercial importance. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam. 1979. P. 459–470.
192. Chou C.P. Engineering cell physiology to enhance recombinant protein production in *Escherichia coli*. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2007. V. 76. № 3. P. 521–532.