



на правах рукописи

Панин Николай Владимирович

**НАПРАВЛЕННЫЙ МУТАГЕНЕЗ ПЕНИЦИЛЛИНАЦИЛАЗЫ ИЗ *Escherichia coli*  
ДЛЯ ИЗМЕНЕНИЯ КАТАЛИТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ И СТАБИЛЬНОСТИ**

02.00.15 кинетика и катализ  
03.01.06 биотехнология  
(в том числе бионанотехнологии)

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Москва 2014

Работа выполнена в отделе биокинетики Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского и на Факультете биоинженерии и биоинформатики Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

**Научные руководители:**

Доктор химических наук, профессор

Швядас Витаутас-Юозапас Каятоно.

Кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник

Гуранда Дорел Феодорович.

**Официальные оппоненты:**

Заведующий лабораторией гомолитических реакций элементоорганических соединений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института элементоорганических соединений имени А.Н.Несмеянова Российской академии наук, доктор химических наук Кочетков Константин Александрович.

Заведующий лабораторией молекулярной биоинженерии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии имени академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова Российской академии наук, доктор химических наук Мирошников Константин Анатольевич.

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии имени А.Н.Баха Российской академии наук.

Защита диссертации состоится «\_\_» октября 2014 года в 15.00 на заседании Совета Д501.00.59 по защите докторских и кандидатских диссертаций по химическим наукам при Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, д.1, стр.11, кафедра химической энзимологии Химического факультета МГУ.

С диссертацией можно ознакомиться в фундаментальной библиотеке МГУ имени М.В.Ломоносова и на сайте Химического факультета МГУ ([www.chem.msu.ru](http://www.chem.msu.ru)) в разделе «Защита диссертаций».

Автореферат разослан «\_\_» сентября 2014 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
Кандидат химических наук



Сакодынская И.К.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Пенициллинацилаза из *Escherichia coli* (есПА) широко используется в фармацевтической промышленности для получения ядер бета-лактамных антибиотиков путем гидролиза природных пенициллинов и цефалоспоринов. Проводится изучение биокатализатора в реакциях энантиоселективного ацилирования аминокислот в водной среде при получении полусинтетических антибиотиков, разделении рацематов, пептидном синтезе с участием неприродных аминокислот, защите свободных аминогрупп и др. Однако ограниченная субстратная специфичность и стереоспецифичность фермента дикого типа, осложнение реакций синтеза протеканием побочных реакций гидролиза, низкая стабильность в щелочной среде и в присутствии высоких концентраций субстратов во многом ограничивают его более широкое применение. Перспективным путем решения проблемы является использование методов белковой инженерии для направленного изменения свойств фермента в зависимости от поставленной задачи.

**Цель и задачи исследования.** Целью исследования являлось обнаружение и характеристика мутаций, приводящих к изменению каталитических свойств и стабильности фермента. В связи с этим основными задачами были:

- анализ и систематизация литературных и патентных данных для установления структурно-функциональных взаимосвязей и определения роли ранее проведенных аминокислотных замен, приводящих к изменению свойств фермента дикого типа;
- определение стратегии и выбор аминокислотных остатков для мутагенеза;
- получение, выделение и очистка новых мутантных форм фермента для последующей характеристики;
- изучение каталитических свойств и стабильности полученных мутантов есПА, их способности катализировать получение полусинтетических пенициллинов, а также стереоселективное ацилирование аминокислот в водной среде;
- установление основных эффектов от введенных мутаций, нахождение закономерностей и корреляций, составление рекомендаций.

**Научная новизна работы.** При выборе стратегии мутагенеза был использован комплексный подход, основанный на анализе последних представлений о структуре и механизме действия фермента, молекулярном моделировании и биоинформатике, что позволило выбрать ранее неизвестные позиции для изменения свойств фермента дикого типа. Получены двадцать семь новых активных мутантных форм есПА. При систематическом изучении их каталитических свойств и стабильности показано, что направленный мутагенез позволяет существенно и целенаправленно изменять свойства фермента. Обнаружено, что введение мутации bF256R позволяет в 4 раза, а в комбинации с aR145G более чем в 20 раз увеличить эффективность ацилирования б-аминопенициллановой кислоты в реакции синтеза бета-лактамных антибиотиков; введение мутации bF71A приводит к 250-кратному увеличению стереоселективности в реакции ацилирования ароматических аминокислот. Установлено, что солевая триада bR297-bE266-bN262 и карбоксил-карбоксилатная пара bE482-bD484 играют существенную роль в поддержании

третичной структуры белка. Отталкивание однозарядной пары остатков bE482-bD484 определяет низкую стабильность есПА дикого типа в щелочной среде. Обнаружена мутация bD484N, позволяющая сохранить взаимодействие между остатками в широком интервале pH, что приводит к 9-кратному увеличению стабильности в щелочной среде, а также в присутствии высоких концентраций субстратов при пептидном синтезе. Впервые показана возможность замены консервативного для пенициллинацилаз N-концевого нуклеофильного серина bS1 на треонин с сохранением каталитической активности путем введения компенсирующей мутации. Установлены прямые корреляции между активностью мутантных форм в реакциях гидролиза хромогенного субстрата и синтеза N-ацильных производных аминокислот, а также эффективностью ацилирования ароматических и алифатических аминокислот.

**Практическая значимость работы.** Показано, что мутант bD484N не только более стабилен в щелочной среде, но и существенно более устойчив к инактивации при высоких концентрациях субстратов, что расширяет границы применимости фермента в препаративном пептидном синтезе. Препараты на основе мутации bF256R характеризуются более чем 4-кратным улучшением эффективности ацильного переноса, что может найти применение в препаративном биокаталитическом получении полусинтетических антибиотиков. Стереоселективность мутанта bF71A к S-фенилацетилфенилаланинолу превышает стереоселективность есПА дикого типа более чем на 2 порядка, что позволяет провести биокаталитическое разделение рацемата аминокислоты и получить индивидуальные энантиомеры высокой оптической чистоты. Разработано программное обеспечение, позволяющее моделировать протекание биокаталитических реакций при варьировании начальных концентраций реагентов и эффективных кинетических параметров.

**Апробация работы.** Основные положения и результаты работы были представлены на зимней молодежной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (2014 г., Москва, ИБХ, лауреат I премии), международном конгрессе «FEBS-2013» (2013, Санкт-Петербург), международных конференциях «Protein Stabilization» (2014, Италия), «Enzyme Engineering XXII» (2013, Япония), «BioTrans-2013» (2013, Англия), «Biocatalysis-2013» (2013, Москва), «BioTrans-2011» (2011, Италия), российском симпозиуме «Белки и пептиды» (2011, Петрозаводск).

**Публикации.** По материалам диссертации подготовлены и опубликованы 4 статьи в рецензируемых научных журналах, получен 1 патент, поданы 2 заявки на изобретение, представлены 11 тезисов докладов международных конференций.

**Структура и объем работы.** Диссертация состоит из следующих разделов: «Введение», «Литературный обзор», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Основные результаты и выводы», «Список литературы», «Приложения». Объем диссертации составляет 200 страниц машинописного текста (в том числе 20 страниц приложений) и включает 76 рисунков, 67 таблиц, 2 диаграммы, 5 схем и 151 библиографическую ссылку.

## ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ

### Мутагенез для повышения каталитической активности

#### Мутации *bS1T*, *bS1C*, *bT68S*, *bS1T+bT68S*

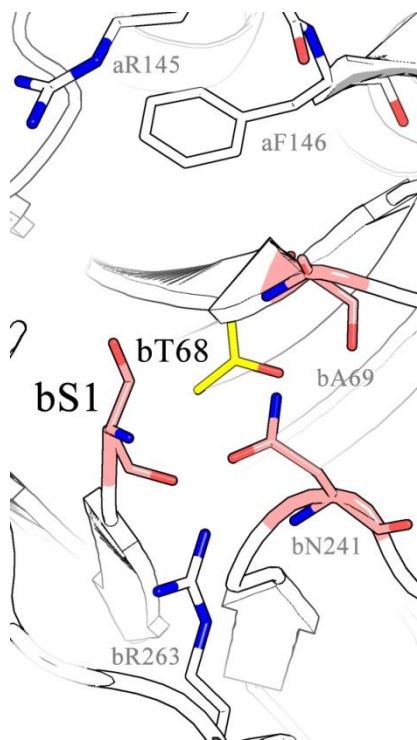


Рисунок 1. Остатки bS1 и bT68 в активном центре есПА.

Остаток bS1 - основной каталитический элемент ПА, определяющий принадлежность фермента к классу Ntn-гидролаз. N-концевой серин характерен для всех известных ПА, способных гидролизовать природный бензилпенициллин. Остаток треонина встречается у протеасом и аспартилглюкозаминидаз, остаток цистеина у глутаминамидотрансфераз (Oinonen, 2000). В активных центрах ферментов возможно изоморфное замещение каталитических групп на родственные по структуре: так, серин иногда может быть замещен на треонин без существенного изменения в механизме катализа (Варфоломеев, 2005). В литературе есть пример, когда замена нуклеофильного серина на треонин приводила к повышению активности вирусной протеазы (Arad, 1995). Ранее корейскими авторами (Choi, 1992) была предпринята попытка замены N-концевого bS1 в есПА на T, R, G и C, однако ни в одном случае не удалось получить фермент в активной форме. Мы предположили, что неспособность мутанта к активации предшественника при замене bS1 на T может являться следствием несоответствия размеров остатков и снижением доступности активного центра.

С целью снятия стерических затруднений была предпринята попытка введения так называемой компенсирующей мутации близрасположенного остатка bT68 на S с получением двойного мутанта bS1T+bT68S. По данным биоинформатического анализа суперсемейства Ntn-гидролаз позиции b1 и b68 являются коррелирующими и меняются синхронно при переходе от одной подгруппы (п/гр) к другой. Подобная комбинация встречается в семействе протеасом. Остаток bT68 находится в непосредственной близости к остатку bS1 (рис. 1) на расстоянии 3.8Å между Cβ атомами. Двойная замена bS1T+bT68S не сопровождается увеличением числа атомов в столь значимом для катализа регионе и, действительно, приводит к получению зрелого и активного белка. Мутант bS1T+bT68S обладал более высокой каталитической активностью по сравнению с ферментом дикого типа (ДТ), при этом наблюдалось как улучшение  $k_{cat}$ , так и  $K_M$  (табл. 1). Следует отметить, что одиночные мутанты bS1T и bS1C не обладали активностью, что согласуется с ранее полученными результатами (Choi, 1992). В то же время одиночный мутант bT68S в 8 раз терял в  $k_{cat}$  и более чем на один порядок в термостабильности, что также свидетельствует о взаимном влиянии мутаций bT68S и bS1T. Важно подчеркнуть, что введение двойной мутации bS1T+bT68S не привело к дестабилизации по сравнению с есПА ДТ.

Таблица 1. Кинетические параметры гидролиза цветного субстрата (NIPAB) и термостабильность для есПА ДТ и мутантов на основе bS1X и bT68S (pH 7, 50°C).

	$k_{cat}, c^{-1}$	$K_M, \mu M$	$k_{cat}/K_M$	$k_{in}, \text{мин}^{-1}$
ДТ	28,0±0,6	23,1±0,8	1,2	7,2±0,1·10 <sup>-4</sup>
bS1T	н.а.	н.а.	н.а.	н.а.
bT68S	3,3±0,2	10,4±0,5	0,3	1,4±0,3·10 <sup>-2*</sup>
bS1T+bT68S	34,5±1,7	19,8±1,0	1,7	9±1·10 <sup>-4</sup>
bS1C	н.а.	н.а.	н.а.	н.а.
bS1C+bT68S	н.а.	н.а.	н.а.	н.а.

\* - приведены данные для pH 7,5; н.а. – нет активности.

Двойной мутант bS1T+bT68S был более эффективным катализатором ацильного переноса (увеличение соотношения начальных скоростей синтеза и гидролиза S/H в 1,4 раза в реакции синтеза ампициллина), а также обладал более высокой каталитической активностью ( $V_0/E_0$ ) при отсутствии существенных изменений в эффективных кинетических параметрах синтеза ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) (табл. 2).

Таблица 2. Кинетические параметры в реакции синтеза ампициллина для есПА ДТ и мутантной формы bS1T+bT68S.

	$V_0/E_0, c^{-1}$	S/H	$\alpha$	$\beta, M^{-1}$	$\gamma$
ДТ	1,5±0,1	1,3±0,1	13±2	54±6	0,14±0,03
aT68S+bS1T	1,7±0,1	1,8±0,2	15±1	61±3	0,12±0,01

$V_0/E_0 (c^{-1})$  – удельная начальная скорость накопления продукта синтеза.

В реакции ацилирования аминспиртов амидом R-миндальной кислоты (R-МК) при использовании двойного мутанта bS1T+bT68S наблюдали почти 2-кратное увеличение каталитической активности для 2-аминобутанола (2-АБ) при сохранении эффективности синтеза (S/H) и стереоселективности (Es). Увеличение активности в случае ацилирования фенилаланинола (ФА) было менее значительным. В то же время для одиночного мутанта bT68S наблюдали значительное ухудшение каталитических свойств (табл. 3).

Таблица 3. Стереоселективность, активность и эффективность ацильного переноса есПА ДТ и мутантов bS1T+bT68S и bT68S в реакции ацилирования 2-АБ и ФА.

	2-АБ + R-МК амид			ФА + R-МК амид		
	$V_0/E_0, c^{-1}$	S/H	Es	$V_0/E_0, c^{-1}$	S/H	Es
ДТ	0,4	0,02	12±1	1	0,1	2,8±0,1
bS1T+bT68S	0,7	0,02	10±1	1,2	0,1	3,1±0,2
bT68S	0,01	0,05	3,0±0,2	н.д.	н.д.	н.д.

н.д. – нет данных.

Таким образом, путем введения двойной мутации bS1T+bT68S удалось получить зрелый и активный фермент. Данная комбинация может рассматриваться как дополнительный фактор улучшения каталитической активности и S/H при конструировании многоточечных мутантов.

### Мутагенез для повышения эффективности синтеза

#### Мутации bF256R, bA255R

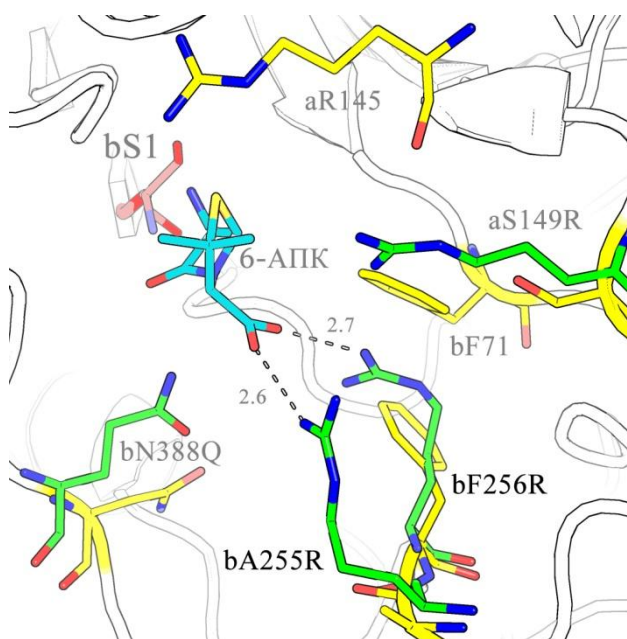


Рисунок 2. Структуры комплексов ацилфермент-нуклеофил есПА ДТ (желтый) и мутантов(зеленый).

Остатки bA255 и bF256 располагаются на участке связывания амидной части субстрата и направлены в раствор, в сторону, где находится карбоксильная группа нуклеофила (рис 2). Мы предположили, что замена данных остатков на заряженный аргинин может привести к появлению дополнительных взаимодействий, фиксации карбоксильной группы и, как следствие, улучшению эффективности синтеза. Как видно из рис. 2, в структурах комплексов ацилфермент-нуклеофил, полученных при помощи методов молекулярной динамики (МД, Строганов, 2007), гуанидиновые группы аргинина в обоих мутантах и карбоксильная группа 6-аминопенициллановой кислоты могут осуществлять дополнительное электростатическое взаимодействие.

В ходе работы нами были получены активные мутанты, содержащие вышеуказанные аргининовые замены, а также дополнительные замены bF71L, aS149R и bN388Q, для которых ранее было установлено влияние на эффективность синтеза. При изучении каталитической активности (табл. 4) было показано, что мутация bF256R

при неизменности  $K_M$  приводит к 2-кратному уменьшению  $k_{cat}$  по сравнению с есПА ДТ. При этом мутация соседнего bA255 остатка в мутанте bA255R+bF71L приводит, наоборот, к 2-кратному увеличению константы специфичности по сравнению с одиночным bF71L. В то же время введение мутации bF256R приводит к 300-кратному увеличению константы инактивации при 50°C, что, по всей видимости, может быть вызвано внесением заряженного остатка в исключительно неполярное окружение.

Таблица 4. Кинетические параметры гидролиза NIPAB для ПА ДТ и мутантов на основе bF256R и bA255R (pH 7, 50°C).

	$k_{cat}, c^{-1}$	$K_M, \mu M$	$k_{cat}/K_M$	$k_{in}, \text{мин}^{-1}$
ДТ	28,0±0,6	23,1±0,8	1,2	6,0±1,0·10 <sup>-3</sup>
bF71L	50±2	10±1	5,0	2,2±0,1·10 <sup>-2</sup>
bF256R	13,7±0,4	27,0±0,8	0,5	1,8±0,2·10 <sup>-1</sup>
bF256R+bF71L	18,4±0,9	7,2±0,6	2,6	3,9±0,5·10 <sup>-2</sup>
bA255R+bF71L	52±2	5,4±0,5	9,7	2,8±0,3·10 <sup>-2</sup>
bF256R+aS149R	23,7±0,7	67±2	0,4	1,5±0,1·10 <sup>-1</sup>
aR145G+bF256R	0,60±0,01	17±1	0,04	3,7±0,5·10 <sup>-2</sup>
bF256R+bN388Q+bF71L	39,4±0,8	5,6±0,5	7,1	2,2±0,4·10 <sup>-1</sup>
aS149R	31±1	25,0±0,7	1,3	14,0±1,0·10 <sup>-3</sup>
bN388Q+bF71L	40±2	7,8±0,5	5,2	1,1±0,1·10 <sup>-1</sup>

В реакции синтеза ампициллина мутация bF256R привела к почти 4-кратному увеличению параметра реакционной способности нуклеофила ( $\beta$ , табл. 5). При этом максимальный выход реакции при эквимольном соотношении донора и нуклеофила (50 мМ) составил 32%, что на 6% превышало выход для есПА ДТ. При использовании более сложного донора ацильной части D-фенилглицилглицина удалось поднять максимальный выход с 50% до 64%. Для двойного мутанта bF256R+aS149R наблюдали 3-кратное улучшение  $\beta$ . Для мутанта bA255R+bF71L улучшение параметра  $\beta$  было менее значительным. Следует отметить, что замена bF256R привела также к 3-кратному увеличению параметра относительной специфичности ( $\alpha$ ), что, судя по всему, вызвано улучшением связывания целевого продукта. Введением дополнительной мутации bF71L удалось более чем в 2 раза уменьшить параметр  $\alpha$  при сохранении эффективности ацильного переноса. Наибольший эффект увеличения параметра  $\beta$  (24 раза) был зафиксирован для двойного мутанта aR145G+bF256R. При этом наблюдали синергизм эффектов от отдельных мутаций. Для параметра



$\alpha$  было характерно взаимное усиление негативных эффектов, а параметр  $\gamma$  уменьшался в 3 раза по сравнению с одиночной мутацией bF256R.

Таблица 5. Кинтетические параметры в реакции синтеза ампициллина для есПА ДТ и мутантов на основе bF256R и bA255R.

	$\alpha$	$\beta, M^{-1}$	$\gamma$	$P_{max}^*$
ДТ	13±2	57±3	0,05±0,01	26%
bF256R	42±5	216±39	0,025±0,009	32%
bF71L	7±1	40±3	0,30±0,03	н.д
bF256R+bF71L	17±1	289±28	0,020±0,005	н.д
bA255R+bF71L	12±1	91±9	0,12±0,01	н.д
bF256R+aS149R	33±4	169±24	0,030±0,009	н.д
aR145G+bF256R	240±28	1340±120	0,008±0,002	н.д
aR145G	29**	423±19	0,002±0,001	н.д

\*- Максимальный выход при начальных условиях  $S_0=N_0=50mM$ .

\*\* По данным Шаповаловой (2008)

Таблица 6. Стереоселективность, каталитическая активность и эффективность ацильного переноса есПА ДТ и мутантов на основе bF256R и bA255R в реакции ацилирования 2-АБ амидом R-МК.

	$V_0/E_0, c^{-1}$	S/H	$E_s$	э.и. <sup>50%</sup>
ДТ	0,4	0,02	12±1	78%
bF71L	1,9	0,3	54±15	96%
bF256R	0,3	0,06	17±3	89%
bF256R+bF71L	0,6	0,54	111±8	98%
bA255R+bF71L	2,0	0,26	82±7	98%
bF256R+aS149R	0,04	0,04	12±2	85%
bF256R+bN388Q+bF71L	0,8	0,34	160±10	99%
aR145G+bF256R	0,2	0,13	35±6	94%

Мутация bF256R привела к увеличению стереоселективности в реакции ацилирования 2-аминобутанола амидом R-миндальной кислоты по сравнению с есПА ДТ (табл. 6). В 3 раза улучшился параметр S/H. При комбинации с мутацией bF71L для двойного мутанта bF256R+bF71L наблюдали 2-кратное улучшение стереоселективности и S/H по сравнению с одиночным мутантом bF71L и 9-кратное по сравнению с есПА ДТ. Такая стереоселективность ( $E=111$ ) вполне достаточна для получения оптически чистого продукта (энантиомерный избыток при условии полной конверсии (э.и.<sup>50%</sup>) более 98%). Еще больший эффект (13 раз) был достигнут при введении дополнительной мутации bN388Q в мутанте bF256R+bN388Q+bF71L (э.и.<sup>50%</sup> 99%). Введение дополнительной мутации aR145G привело к 2-кратному увеличению стереоселективности и S/H по сравнению с одиночной заменой bF256R.

В реакции ацилирования фенилаланинола (табл. 7) введение мутации bF256R привело к почти 3-кратному увеличению стереоселективности. Двойная мутация bA255R+bF71L привела к 2-кратному увеличению стереоселективности по сравнению с одиночным bF71L и к более чем 20-кратному эффекту по сравнению с есПА ДТ. Интересно отметить, что мутации bF256R и bA255R, которые приводят к заметному улучшению параметров S/H и  $\beta$  в реакции синтеза ампициллина, в данном случае не повлияли на эффективность ацильного переноса, в то время как мутация bF71L, приводящая к ухудшению параметра  $\beta$  в реакции синтеза ампициллина, при ацилировании фенилаланинола привела к многократному улучшению эффективности переноса.

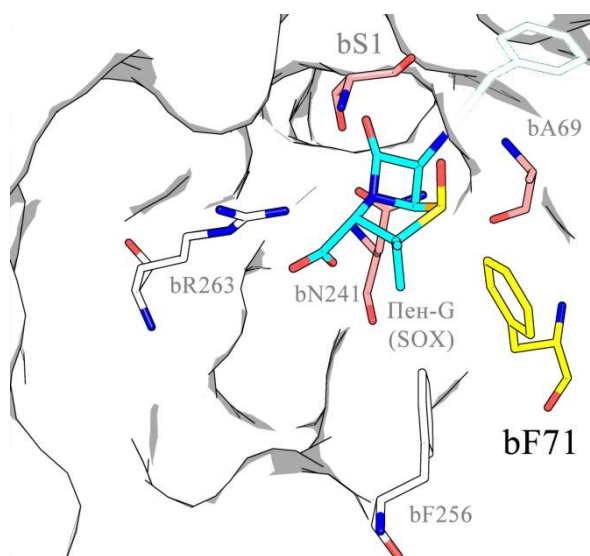
Таблица 7. Стереоселективность, каталитическая активность и эффективность ацильного переноса есПА ДТ и мутантов на основе bF256R и bA255R при ацилировании ФА амидом R-МК.

	$V_0/E_0, c^{-1}$	S/H	$E_s$	э.и. <sup>50%</sup>
ДТ	1,0	0,1	2,8±0,1	57%
bF71L	4,4	1	27±1	93%
bF256R	0,1	0,07	8±1	78%
bF256R+bF71L	0,1	0,1	20±2	90%
bA255R+bF71L	4,0	0,9	59±9	97%

Таким образом, мутация bF256R, и особенно в комбинации с aR145G, может быть рекомендована для значительного улучшения параметров S/H и  $\beta$  в реакциях синтеза бета-лактамных антибиотиков, а также, наряду с bA255R и в комбинации с мутацией bF71L, для эффективного разделения рацематов аминок спиртов. Однако, следует принимать во внимание ухудшение стабильности при введении аргининовых мутаций в данном регионе.

## Мутагенез для повышения стереоселективности

### Мутации bF71L, bF71A



Остаток bF71 находится в области связывания амидной части субстрата, образуя Ван-дер-Ваальсовы контакты с тиазолидиновым кольцом бензилпенициллина, а также частично формирует горлышко гидрофобного кармана (рис. 3). В закрытой конформации остаток находится в стэкинге с bF256. В литературе описаны мутантные формы есПА bF71C и bF71L, характеризующиеся увеличением каталитической активности в реакции гидролиза цветного субстрата NIPAB (Morillas, 2003). Известно, что мутация bF71L также приводит в 3-4-кратному увеличению стереоселективности в реакциях гидролиза N-ацильных производных 2-аминобутанола и фенилаланинола по сравнению с есПА ДТ (Ямскова, 2011). Принимая во внимание, что уменьшение размеров 71 остатка при сохранении

Рисунок 3. Остаток bF71 в структуре есПА.

его гидрофобности приводит к увеличению хиральной дискриминации, нами было предложено усилить эффект за счет замены на еще меньший остаток аланина.

При изучении каталитической активности в реакции гидролиза цветного субстрата (табл. 8) для мутанта bF71L было зафиксировано 4-и кратное (за счет улучшения  $k_{cat}$  и  $K_M$ ), а для мутанта bF71A почти 2-х кратное улучшение константы специфичности (за счет улучшения  $K_M$ ). Данные мутации не привели к значительному снижению термостабильности.

Таблица 8. Кинетические параметры гидролиза NIPAB и стабильность для есПА ДТ и мутантов bF71L/A (pH 7,0; 50°C).

	$k_{cat}, c^{-1}$	$K_M, \mu M$	$k_{cat}/K_M$	$k_{in}, мин^{-1}$
ДТ	28,0±0,6	23,1±0,8	1,2	6,0±1,0·10 <sup>-3</sup>
bF71L	50±2	10±1	5,0	2,2±0,1·10 <sup>-2</sup>
bF71A	21±2	9±1	2,3	1,6±0,2·10 <sup>-2</sup>

В отношении стереоспецифичности для мутанта bF71L наблюдали почти 5-кратное улучшение стереоселективности в реакции ацилирования алифатического 2-аминобутанола амидом R-миндальной кислоты (табл. 9). Для данной мутации также было характерно 15-кратное улучшение параметра S/N и почти 5-кратное улучшение каталитической активности. Как и предполагалось, еще большего увеличения параметра стереоселективности удалось достичь при замене остатка bF71 на A, что является принципиальным для препаративного получения индивидуальных энантиомеров аминспирта (см. значение э.и.<sup>50%</sup> в табл.9). В реакции ацилирования 2-аминобутанола амидом S-миндальной кислоты для мутанта bF71L наблюдали инверсию активной формы и более активным являлся R-энантиомер.

Таблица 9. Стереоселективность, каталитическая активность и эффективность ацильного переноса есПА ДТ и мутантов bF71L/A в реакциях ацилирования 2-АБ.

	2-АБ + R-МК амид				2-АБ + S-МК амид			
	$V_0/E_0, c^{-1}$	S/N	$E_s$	э.и. <sup>50%</sup>	$V_0/E_0, c^{-1}$	S/N	$E_s$	э.и. <sup>50%</sup>
ДТ	0,4	0,02	12±1	78%	0,3	0,05	2,3±0,1	39%
bF71L	1,9	0,3	54±15	96%	0,1	0,16	1,7±0,2(R)	26%
bF71A	0,4	0,1	80±17	98%	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.

При ацилировании амидом R-миндальной кислоты ароматического фенилаланинола, наряду с 10-кратным улучшением S/N и более чем 3-кратном увеличением скорости реакции, наблюдали еще более значительное улучшение стереоселективности, чем для алифатического спирта. При этом для bF71L характерно 10-кратное, а для bF71A более значительное 250-кратное увеличение параметра (табл. 10).

Таблица 10. Стереоселективность, каталитическая активность и эффективность ацильного переноса есПА ДТ и мутантов bF71L/A в реакции ацилирования ФА амидом R-МК.

	$V_0/E_0, c^{-1}$	S/N	$E_s$	э.и. <sup>50%</sup>
ДТ	1	0,1	2,8±0,1	47%
bF71L	4,3	1	27±1	93%
bF71A	1,4	1	700±300	99,7%

Для объяснения полученного результата мы провели множественный докинг образующихся в реакции ацилирования отдельных энантимеров манделилфенилаланинола (МФА, рис. 4) в структуры есПА ДТ и bF71A.

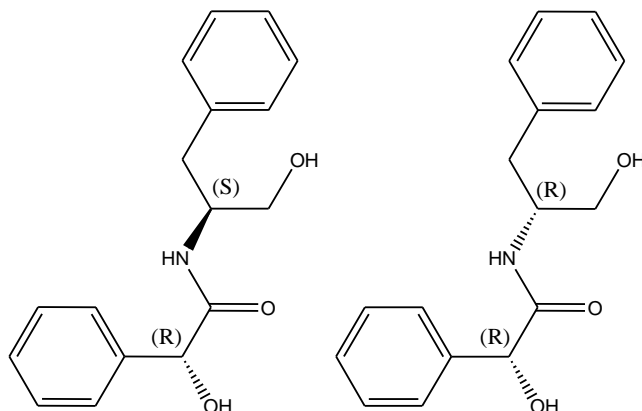


Рисунок 4. Структурные формулы S-МФА (слева) и R-МФА (справа).

Как видно из рисунка 5, в результате всех проведенных докингов в структуру есПА ДТ продуктивная конформация S-МФА занимает строго определенное положение, так что бензольное кольцо субстрата находится в непосредственной близости к остатку bF71 (рис. 5А), тогда как положение продуктивной конформации R-МФА менее определенное (рис. 5Б). Этой ситуации отвечает 0,5 ккал/моль разница средней рассчитанной минимальной энергии связывания (табл. 11).

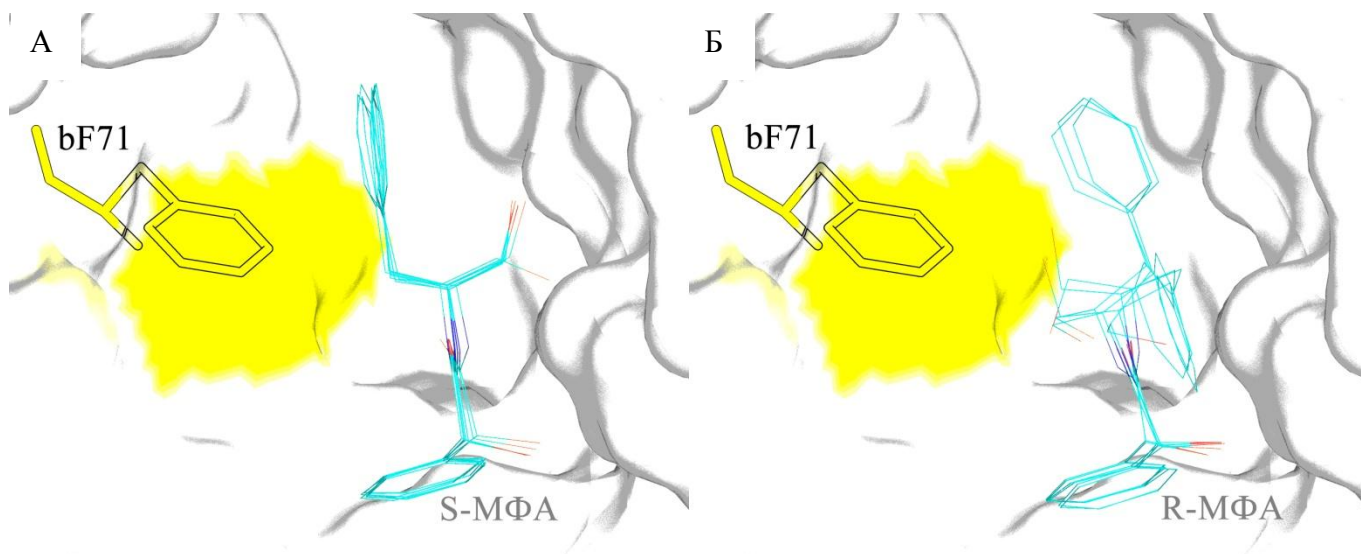


Рисунок 5. Докинг S-МФА (А) и R-МФА (Б) в структуру есПА ДТ 1gm9. Представлены результаты 7 докингов для конформаций субстрата, характеризующиеся минимальной рассчитанной энергией связывания.

При удалении фенильного радикала в мутанте bF71A (рис. 6) появляется свободное пространство, которое становится доступно для фенильного радикала S-МФА (рис. 6А). В случае с R-МФА картина практически не меняется - положение продуктивной конформации также определено менее строго (рис. 6Б), что находит отражение в более значительной разнице средней рассчитанной минимальной энергии связывания 1 ккал/моль (табл. 11). Это обстоятельство свидетельствует о появлении более существенной дискриминации энантиомеров на уровне связывания в случае замены bF71A.

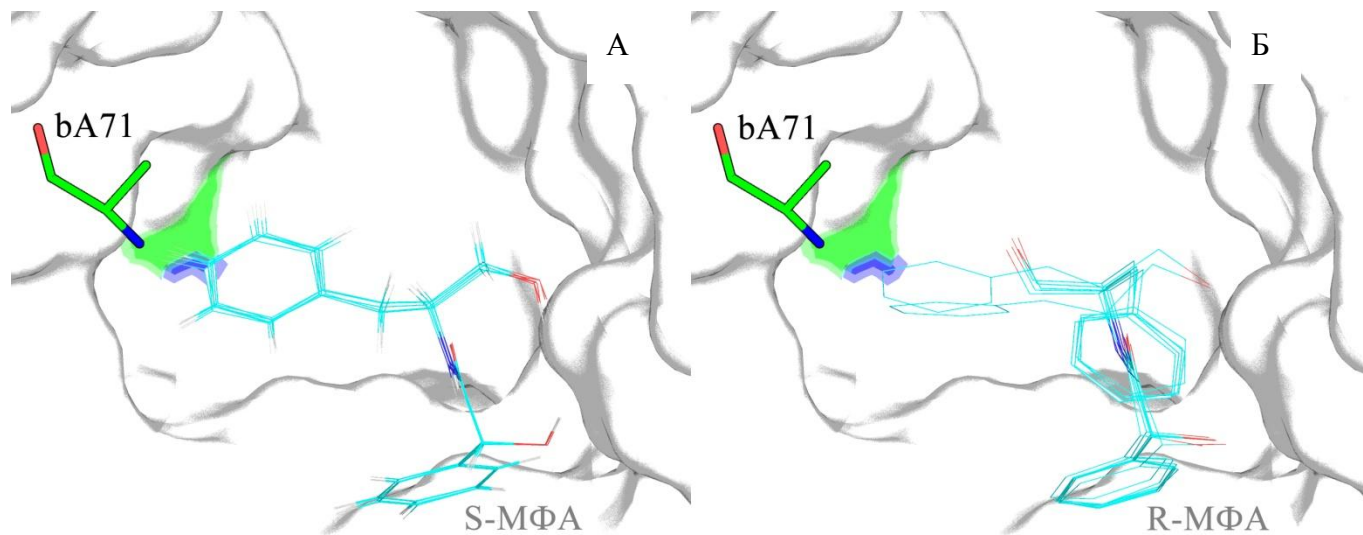


Рисунок 6. Докинг S-МФА (А) и R-МФА (Б) в структуру есПА bF71A. Представлены результаты 7 докингов для конформаций субстрата, характеризующиеся минимальной рассчитанной энергией связывания.

Таблица 11. Средняя рассчитанная минимальная энергия связывания на основании 25 докингов для каждой пары фермент/субстрат с учетом стандартного отклонения.

Фермент	ДТ		bF71A	
	S-МФА	R-МФА	S-МФА	R-МФА
-dG, ккал/М	6,7±0,4	6,2±0,4	7,2±0,5	6,2±0,5

Таким образом, мутации bF71L и bF71A можно рекомендовать для улучшения стереоселективности в реакции ацилирования аминоспиртов амидом R-миндальной кислоты. Мутантная форма bF71A может потенциально рассматриваться как катализатор для получения 2-аминобутанола и фенилаланинола в оптически чистой форме.

## Мутагенез для повышения и изучения стабильности

### Мутации bQ292R, bI329E

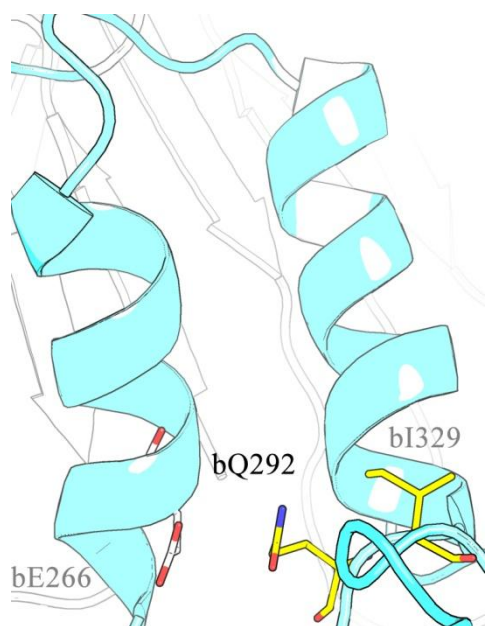


Рисунок 7. Остатки bQ292, bE266 и bI329 в структуре есПА ДТ.

С целью повышения стабильности есПА за счет введения дополнительного электростатического взаимодействия между остатками b292 и b266 был получен мутант bQ292R. Расстояние между карбонильными атомами остатков bQ292 и bE266 в структуре 1gm9 составляет 4,2 Å, что позволяет говорить о возможности образования солевого мостика между вводимым аргинином и глутаматом. Если такой мостик мог бы образоваться, то это привело бы к формированию нового и единственного контакта между соседними альфа-спиралями, и, как следствие, ограничению их подвижности и улучшению стабильности (рис. 7). Для дополнительной фиксации вводимого аргинина нами была предложена мутация bI329E. Следует отметить, что подобная система мостиковых взаимодействий, по-видимому, реализуется в ПА из *Kluuvera citrophila*, характеризующейся расширенным профилем рН-стабильности.

Экспериментально было показано, что положительный эффект от мутации bQ292R наблюдается в области кислых рН. Из таблицы 12 видно, что позитивный эффект усиливается при уменьшении рН, а также при внесении фиксирующей мутации. Так, для двойного мутанта bQ292R+bI329E имеет место 2-кратное улучшение стабильности при рН 4,0 по сравнению с есПА ДТ.

Таблица 12. Константы инактивации ( $k_{in}$  мин<sup>-1</sup>) для есПА ДТ и мутантов при 50°C.

	рН 4,0	рН 5,0
ДТ	$1,9 \pm 0,1 \cdot 10^{-2}$	$4,6 \pm 0,4 \cdot 10^{-4}$
bQ292R	$1,5 \pm 0,1 \cdot 10^{-2}$	$5,5 \pm 0,5 \cdot 10^{-4}$
bQ292R+bI329E	$8,8 \pm 0,5 \cdot 10^{-3}$	$2,8 \pm 0,4 \cdot 10^{-4}$

### Мутации bD484N, bD484H

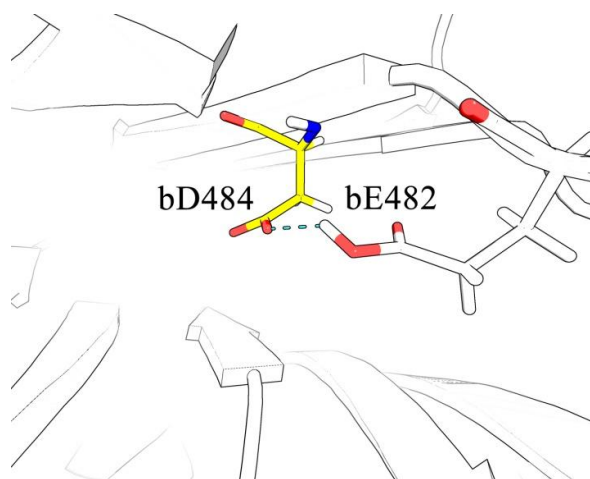


Рисунок 8. Остатки bD484 и bE482 в структуре есПА ДТ.

Остаток bD484 расположен с «обратной» стороны активного центра, в одном бета-листе с каталитическим bS1, находящемся в структуре альфа-бета-бета-альфа домена. В непосредственной близости располагается такой же кислотный bE482 (рис. 8), который по расчетам программы «Protpka» имеет аномально высокий pKa (13,8) и образует так называемую карбоксил-карбоксилатную пару (водородную связь) с отрицательно заряженным bD484, вовлеченную в сеть водородных взаимодействий (рис. 9А). При высоких pH происходит частичное депротонирование и реализуется отталкивание соседних кислотных групп, в конечном итоге, приводит к потере координации воды, разъезжанию параллельных бета-листов и заполнению объема растворителем (рис. 9Б).

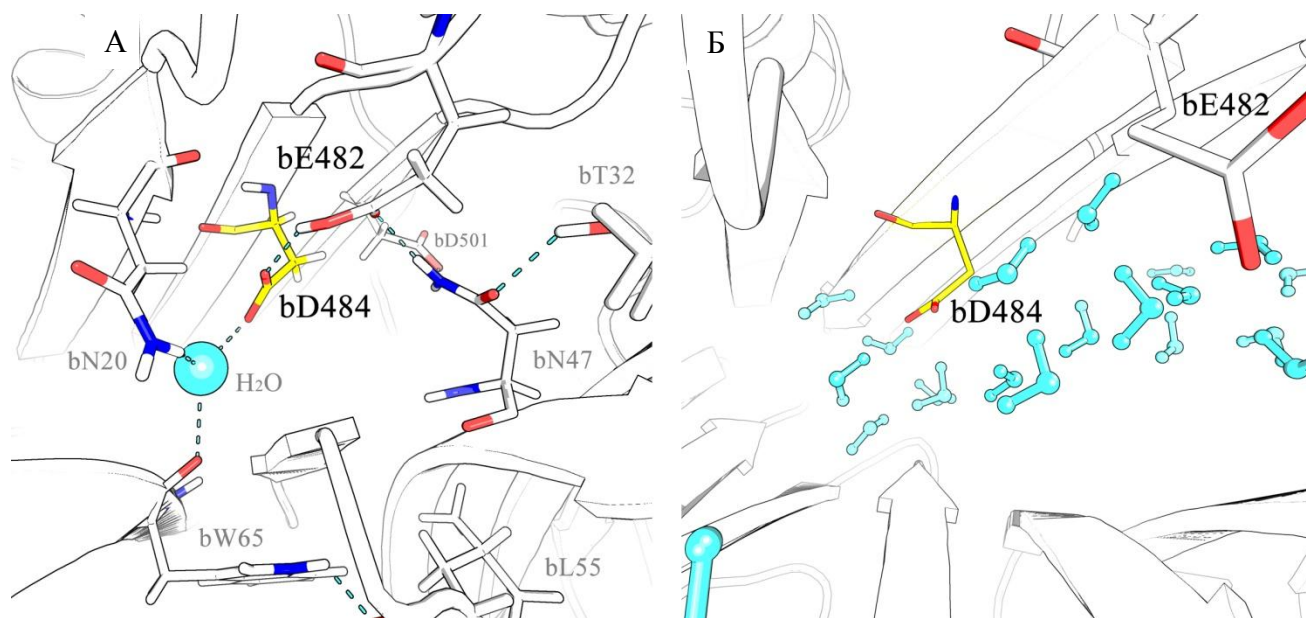


Рисунок 9 А: Сеть водородных взаимодействий есПА ДТ в регионе, содержащем остатки bE482-bN484, при pH 7,5. Б: Разрушение сети взаимодействий при pH 10,0.

По данным биоинформатического анализа суперсемейства Ntn-гидролаз b484 и b482 являются высокогруппспецифичными. D в позиции b484 присутствует в 50% ПА п/гр 1, содержащей есПА. В п/гр 2 в 80% ПА присутствует N, в том числе в ПА из *Alcaligenes faecalis*, характеризующейся наиболее высокой щелочной стабильностью. В п/гр 4, содержащей ПА из *Bacillus megaterium*, также характеризующейся повышенной щелочной стабильностью,



наблюдается исключительно Н. При этом в большинстве описанных случаев (80%) в позиции b482 присутствует «комплементарный» Е. Исключение составляет п/гр 3, для которой, как в позиции b484, так и в b482 наблюдаются гидрофобные ароматические и алифатические остатки, соответственно. Таким образом, сеть водородных взаимодействий, характерных для п/гр 1, 2 и 4, заменяется, по всей видимости, гидрофобным кластером. Для выяснения возможностей стабилизации есПА в щелочной среде путем мутации карбоксильной группы b484 на амидную, как это имеет место в случае ПА из *Alcaligenes faecalis*, нами были рассчитаны МД траектории для региона, содержащего остатки b484-b482, для есПА ДТ и мутантной формы bD484N. Как видно из рисунка 10, при рН 10,0 для есПА ДТ наблюдается значительное изменение подвижности региона (красная кривая), которое реализуется вследствие отталкивания одноименных зарядов, что соответствует картине, представленной на рис. 9Б. В случае мутанта bD484N отталкивания не происходит, что находит отражение в сохранении стабильности региона (зеленая кривая).

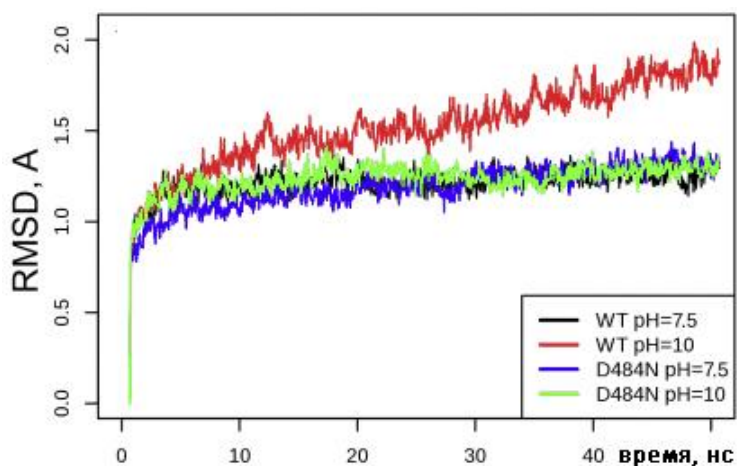


Рисунок 10. МД траектории для региона, содержащего остатки bE482-bN484.

По аналогии с ПА из *Alcaligenes faecalis* и *Bacillus megaterium* нами были получены мутанты bD484N и bD484H, соответственно. Введенные мутации привели к незначительному уменьшению каталитической константы и константы Михаэлиса (табл. 13). При изучении щелочной стабильности в случае мутации bD484N было зафиксировано 9-кратное уменьшение константы инактивации при рН 10,0. При этом, как и ожидалось, не наблюдали эффекта стабилизации в области нейтральных рН. Было показано, что данный эффект не связан с изменениями каталитических свойств при увеличении рН. Мутант bD484N был не только более стабилен в щелочной среде, но и существенно более устойчив к инактивации при высоких концентрациях субстратов, что расширяет границы применимости фермента в препаративном пептидном синтезе. Интересно, что мутация bD484H и введение в данное положение остатка характерного для ПА из *Bacillus megaterium* приводила к снижению стабильности фермента. В случае есПА это может быть вызвано несоответствием размеров заменяемого остатка и доступной для этого полости.

Таблица 13. Кинетические параметры гидролиза NIPAB и стабильность для есПА ДТ и мутантов bD484N/H при pH 7,5 (50°C) и pH 10,0 (25°C).

	$k_{cat}, c^{-1}$	$K_M, \mu M$	$k_{cat}/K_M$	$k_{in}^{pH7,5}, \text{мин}^{-1}$	$k_{in}^{pH10,0}, \text{мин}^{-1}$
ДТ	28,0±0,6	23,1±0,8	1,2	9±1·10 <sup>-3</sup>	2,6±0,8·10 <sup>-3</sup>
bD484N	19,5±0,9	14,8±0,5	1,3	8±1·10 <sup>-3</sup>	2,9±0,1·10 <sup>-4</sup>
bD484H	22,6±0,9	14,9±0,5	1,5	8±1·10 <sup>-2</sup>	7,5±0,9·10 <sup>-3</sup>

Таким образом, мутацию bD484N можно рекомендовать в качестве фактора улучшения щелочной и операционной стабильности.

### Мутация bR297A

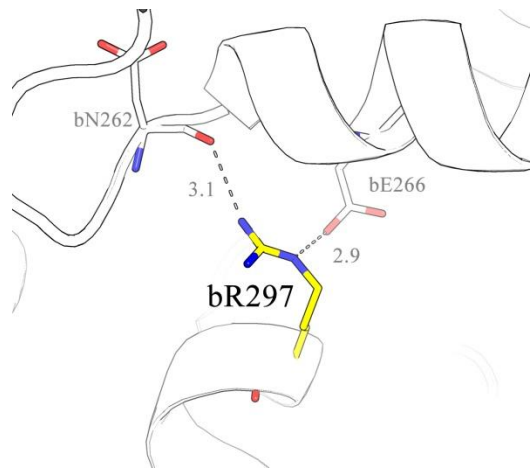


Рисунок 11. Остаток bR297 в структуре есПА и его полярные контакты.

Внутренние солевые мостики могут играть существенную роль в поддержании структуры (Cai, 2004). Также они могут выступать как потенциальные мишени для улучшения термостабильности при замене солевых триад на гидрофобные (Waldburger, 1995). При проведении биоинформатического анализа суперсемейства Ntn-гидролаз было установлено, что R в позиции b297 (рис. 11), также как и E в позиции b266, консервативны для п/гр 1-3. Среди глутарил-7-АЦК ацилаз в позиции b297 встречается исключительно кислый (D или E) остаток, в то время как в «комплементарной» позиции b266, наоборот, присутствует положительный R.

Для проверки роли солевой триады bR297-bE266-bN262 (рис. 11) в поддержании структуры есПА была получена мутация bR297A, которая привела к значительному падению стабильности при практически неизменных кинетических параметрах гидролиза цветного субстрата (табл. 14).

Таблица 14. Кинетические параметры гидролиза NIPAB и стабильность для есПА ДТ и мутанта bR297A при pH 7,5 (50°C) и pH 10,0 (25°C).

	$k_{cat}, c^{-1}$	$K_M, \mu M$	$k_{cat}/K_M$	$k_{in}^{pH7,5}, \text{мин}^{-1}$	$k_{in}^{pH10,0}, \text{мин}^{-1}$
ДТ	28,0±0,6	23,1±0,8	1,2	7,2±0,1·10 <sup>-4</sup>	2,2±0,1·10 <sup>-3</sup>
bR297A	29±1	22,3±0,8	1,3	5,4±0,4·10 <sup>-2</sup>	2,1±0,1·10 <sup>-2</sup>

Константа инактивации при 50°C увеличилась более чем в 70 раз, что свидетельствует о существенной роли триады в поддержании третичной структуры белка.

### Анализ экспериментальных данных

На диаграмме 1 на странице 20 отражены относительные изменения (ось ординат) различных каталитических свойств (левая ось абсцисс) мутантных форм есПА (правая ось абсцисс) по сравнению с есПА ДТ. Ось ординат ограничена 20-кратным увеличением свойств, при этом значения более значимых эффектов приведены сверху столбцов. Мутации, по которым не проводилось изучение каталитических свойств в реакциях синтеза на диаграмме не представлены.

При систематическом анализе экспериментальных данных нами были установлены два типа корреляций - прямые зависимости между каталитической активностью мутантных форм в реакциях гидролиза цветного субстрата и синтеза N-ацильных производных аминокислот (рис. 12А), а также между эффективностями ацилирования ароматических и алифатических аминокислот (рис. 12Б).

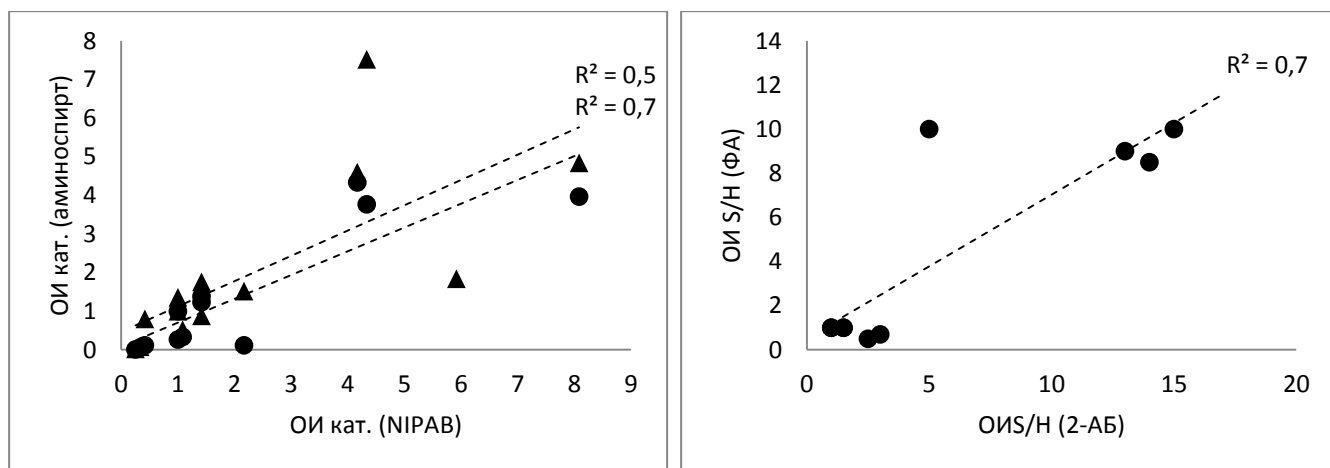


Рисунок 12 А: Корреляции между относительным изменением (ОИ) каталитической активности в реакции гидролиза NIPAB ( $k_{cat}/K_M$ ) и в реакции ацилирования аминокислот ( $V_0/E_0$ ) для мутантных форм есПА. ▲-2-АБ, ● – ФА; Б: Корреляции между относительным изменением параметра S/Н в реакции ацилирования 2-АБ и ФА для мутантных форм есПА.

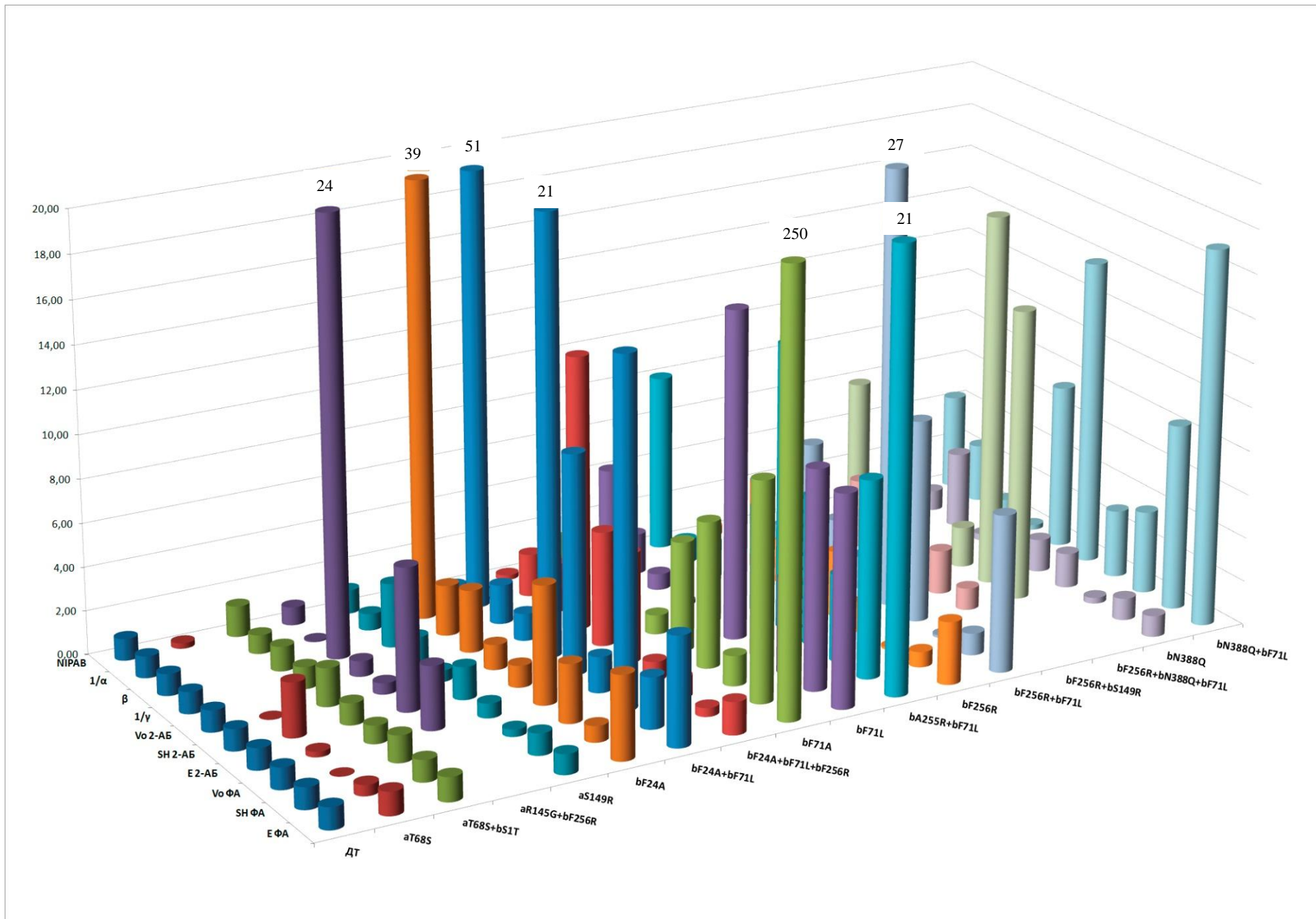


Диаграмма 1. Сводная диаграмма мутантов есПА с измененными каталитическими свойствами.

## ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. С помощью направленного мутагенеза получены двадцать семь новых активных мутантных форм пенициллинацилазы из *Escherichia coli*. На основании систематического изучения их каталитических свойств и стабильности показано, что направленный мутагенез позволяет существенно и целенаправленно изменять свойства фермента.

2. Связывание и ориентация 6-аминопенициллановой кислоты при введении мутации bF256R позволяет в 4 раза, а в комбинации с aR145G более чем в 20 раз увеличить эффективность ацилирования в реакции синтеза бета-лактамных антибиотиков; обеспечение более эффективного связывания S-формы аминспирта за счет введения мутации bF71A приводит к 250-кратному увеличению стереоселективности в реакции ацилирования ароматических аминспиртов.

3. Установлено, что солевая триада bR297-bE266-bN262 и карбоксил-карбоксилатная bE482-bD484 пара играют существенную роль в поддержании третичной структуры белка. Отталкивание однозарядной пары остатков bE482-bD484 определяет низкую стабильность пенициллинацилазы из *Escherichia coli* в щелочной среде. Обнаружена мутация bD484N, которая позволяет сохранить взаимодействие между остатками в щелочной среде и приводит к 9-кратному увеличению щелочной, а также операционной стабильности.

4. Показана возможность замены консервативного для пенициллинацилаз N-концевого нуклеофильного серина bS1 на треонин с сохранением каталитической активности путем введения компенсирующей мутации.

5. Обнаружены прямые корреляции между активностью мутантных форм в реакциях гидролиза цветного субстрата и синтеза N-ацильных производных аминспиртов, а также между эффективностями ацилирования ароматических и алифатических аминспиртов.

## СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

1. D. Suplatov, N. Panin, E. Kirilin, T. Shcherbakova, P. Kudryavtsev, V. Švedas. Computational Design of a pH Stable Enzyme: Understanding Molecular Mechanism of Penicillin Acylase's Adaptation to Alkaline Conditions // PlosOne. 2014. Т. 9. № 6. С. e100643.
2. N. Panin, D. Suplatov, E. Kirilin, T. Shcherbakova, P. Kudravtsev, V. Svedas. Bioinformatic analysis and molecular modeling reveal mutation bD484N to stabilize penicillin acylase and improve its catalytic performance in alkaline medium // FEBS J. 2013. Т. 280. С. 614.
3. F. Novikov, O. Stroganov, I. Khaliullin, N. Panin, I. Shapovalova, G. Chilov, V. Svedas. Molecular modeling of different substrate binding modes and their role in penicillin acylase catalysis. // FEBS J. 2013. № 280. С. 115–126.
4. И. Шаповалова, Н. Панин, В. Тахавеев, Н. Мисюра, Д. Суплатов. Биоинформатический анализ структурных взаимосвязей в удаленных гомологах суперсемейства альфа-бета гидролаз // Современные проблемы науки и образования. 2012. № 6. С. 1–8.
5. Т. Щербакова, Н. Панин, Д. Гуранда, В. Швядас. Способ синтеза пептидов, в том числе бета-лактамных антибиотиков, при использовании варианта пенициллинацилазы // Заявка на изобретение № 2012116430. Решение о выдаче патента 18.06.2014. Заявитель “Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова.” 2013.
6. Д. Суплатов, П. Кудрявцев, Н. Панин, Т. Щербакова, В. Швядас. Мутант пенициллинацилазы из E.Coli с улучшенными свойствами // Заявка на изобретение № 2012116431 от 10.11.2013, Бюл. № 31 Заявитель “Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова.” 2013.
7. Д. Гуранда, О. Ямскова, Н. Панин, В. Швядас. Способ улучшения каталитических свойств пенициллинацилазы // Заявка на изобретение № 2009142994 от 23.11.2009. Заявитель “Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова.” 2009.
8. V. Švedas, N. Panin, T. Shcherbakova, D. Suplatov. Computational design of stabilized penicillin acylase to improve its catalytic performance in alkaline medium // 10th Int. Conf. Protein Stab. Italy L36, Stresa. 2014. С. 42.
9. Н. Панин, П. Кудрявцев, А. Забильская, Д. Суплатов, О. Строганов, В. Швядас. Направленный мутагенез пенициллинацилазы из Escherichia coli для изменения каталитических свойств и стабильности // Зимняя молодежная научная школа “Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии”, Москва, ИБХ. 2014. С. 97.
10. D. Suplatov, N. Panin, E. Kirilin, T. Shcherbakova, P. Kudryavtsev, V. Švedas. Rational design of penicillin acylase based on bioinformatic analysis and molecular modeling to improve enzyme catalytic performance in alkaline medium // Abstr. Int. Conf. Enzym. Eng. XXII Emerg. Top. Enzym. Eng. Japan (Toyama), Sept. 2013. С. 202.
11. N. Panin, D. Suplatov, E. Kirilin, T. Shcherbakova, P. Kudryavtsev, V. Švedas. Rational design of penicillin acylase from Escherichia coli based on bioinformatic analysis and molecular modeling to improve its catalytic performance in alkaline medium // Int. Conf. “BioTrans 2013”, Manchester, July 21-25. 2013. С. 304.
12. D. Suplatov, I. Khaliullin, N. Panin, V. Švedas. Bioinformatic analysis of sequence and structural data to study structure-function relationship in diverse protein superfamilies and develop novel enzyme

- engineering strategies. Plenary lecture. // Int. Conf. "Biocatalysis-2013", Moscow, July 2-5. 2013. C. 25–26.
13. N. Panin, D. Suplatov, E. Kirilin, T. Shcherbakova, P. Kudryavtsev, V. Švedas. Bioinformatic analysis and molecular modeling reveal mutation bD484N to stabilize penicillin acylase and improve its catalytic performance in alkaline medium // Int. Conf. "Biocatalysis-2013", Moscow, July 2-5. 2013. C. 90.
14. N. Panin, I. Shapovalova, D. Guranda, V. Svedas. Improved catalytic properties of mutant penicillin acylases from *Escherichia coli* in acylation of amino compounds // Int. Symp. "Biotrans-2011", Giardini Naxos, Italy, Oct. 2-6. 2011. C. 131.
15. Н. Панин, Т. Щербакова, Д. Гуранда, В. Шведас. Стереоселективность мутантных форм пенициллинацилазы из *E.coli*  $\alpha$ S149R и  $\beta$ F71L в реакциях ацилирования аминоксоединений // Российский симпозиум "Белки и пептиды." 2011. С. 231.
16. V. Švedas, D. Guranda, P. Kudryavtsev, N. Panin. Efficient enantiomeric analysis of primary amines and amino alcohols by high-performance liquid chromatography with precolumn derivatization using novel chiral SH-reagents // Mater. "The 13th Annu. Meet. Isr. Anal. Chem. Soc. Tel Aviv, Isr. January 19-20. 2010. C. 128.
17. Д. Ф. Гуранда, А. В. Немухин, Б. Л. Григоренко, В. И. Тишков, Д. А. Суплатов, Н. В. Панин и др.. Рациональный дизайн промышленных ферментов, основанный на методах молекулярного моделирования. // Материалы итоговой конференции по результатам выполнения мероприятий за 2009 год в рамках приоритетного направления «Живые системы» ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 . 2009. С. 251–252.
18. D. Guranda, P. Kudryavtsev, N. Panin, V. Svedas. Synthesis of novel functionalized thiols catalyzed by penicillin acylase in aqueous medium. Their application as effective SH-reagents for chiral HPLC analysis of primary amino compounds // Int. Conf. "Biocatalysis." 2007. C. 60–61.
19. P. Kudryavtsev, D. Guranda, G. Ushakov, N. Panin, A. Bibin, A. Godina, V. Svedas. Biocatalytic resolution of amino compounds by using penicillin acylase in aqueous medium // Int. Conf. "Biotechnology." 2007. C. 60.
20. D. Guranda, P. Kudryavtsev, G. Ushakov, N. Panin, A. Bibin, A. Sidorova, V. Svedas. Biocatalytic resolution of amino compounds by using penicillin acylase in aqueous medium // Int. Symp. "Advanced Sci. Org. Chem. 2006. C. 43.
21. P. Kudryavtsev, M. Baranov, N. Panin, R. Alekseev, M. Ulanovskaya, D. Guranda. Chemo-enzymatic synthesis of polyfunctionalized thiols and their application for chiral HPLC analysis // Int. Conf. "Biocatalysis." 2005. C. 87.