

Московский Государственный Университет имени М.В.Ломоносова

Факультет биоинженерии и биоинформатики

Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского

на правах рукописи

Панин Николай Владимирович

**Направленный мутагенез пенициллинацилазы из *E.coli*
для изменения каталитических свойств и стабильности**

02.00.15 кинетика и катализ

03.01.06 биотехнология

(в том числе бионанотехнологии)

диссертация на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Научные руководители:

д.х.н., профессор Швядас В.К.

к.х.н., в.н.с. Гуранда Д.Т.

Москва 2014

Диссертация посвящается светлой памяти моего отца

Панина Владимира Григорьевича.

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	7
ВВЕДЕНИЕ	12
1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	15
1.1 Пенициллинацилаза	15
1.1.1 Общие сведения.....	15
1.1.1.1 Физиологическая роль ПА.....	15
1.1.1.2 Каталитическая активность	15
1.1.1.3 Субстратная специфичность	16
1.1.1.4 Стереоспецифичность	18
1.1.2 Основные области применения ПА.....	19
1.1.2.1 Получение бета-лактамовых антибиотиков	19
1.1.2.2 Разделение энантиомеров аминсоединений	24
1.1.3 Структурно-функциональные особенности есПА	26
1.1.3.1 Структура предшественника	26
1.1.3.2 Активный центр.....	26
1.1.3.3 Механизм катализа.....	27
1.1.3.4 Конформационные переходы в активном центре.	29
1.1.3.5 Участок связывания ацильной части.	31
1.1.3.6 Участок связывания амидной части.	32
1.1.3.7 Локализация участка связывания бета-лактамовых нуклеофилов.	34
1.2. Белковая инженерия и поиск новых ПА	36
1.2.1 Поиск природных ПА	38
1.2.2 Белковая инженерия ПА.....	46

1.2.2.1	Случайный мутагенез	46
1.2.2.2	Направленный мутагенез	49
1.2.2.3	Комбинированные методы	58
1.2.2.4	Расширение возможностей белковой инженерии	66
1.2.3	Заключение	68
2	МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	70
2.1	Материалы и оборудование.....	70
2.2	Методы.....	73
2.2.1	QuikChange ПЦР мутагенез.....	73
2.2.2	ПЦР мутагенез с перекрыванием.....	74
2.2.3	Наработка биомассы	75
2.2.4	Выделение и очистка мутантных препаратов ПА.....	75
2.2.5	Приготовление компетентных клеток.....	76
2.2.6	Электрофорез в агарозном геле	77
2.2.7	Электрофорез в полиакриламидном геле	77
2.2.8	Секвенирование.....	79
2.2.9	Титрование активных центров.....	79
2.2.10	Определение кинетических параметров гидролиза цветного субстрата	79
2.2.11	Изучение рН- и термостабильности	79
2.2.12	Ингибиторный анализ.....	80
2.2.13	Определение параметра S/N.....	80
2.2.14	Определение параметров β и γ	81
2.2.15	Определение параметра α	81
2.2.16	Определение максимального выхода реакции	81
2.2.17	Определение стереоселективности в реакции ацилирования 2-аминобутанола и фенилаланинола	82

2.2.18	Определение стереоселективности в реакции гидролиза фенилацетилфенилаланинола	82
2.2.19	ВЭЖХ	83
2.2.20	Компьютерное моделирование	85
2.2.21	Методы статистической обработки результатов.....	86
3	РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	87
3.1	Постановка задачи.....	87
3.2	Получение генов мутантных форм.....	91
3.3	Экспрессия, выделение и очистка	96
3.4	Титрование активных центров, каталитическая активность и термостабильность ..	98
3.5	Эффективность синтеза	103
3.5.1	Определение параметров α, β, γ	103
3.5.2	Уточнение к вычислению параметра α	107
3.6	Стереоселективность	110
3.7	Анализ экспериментальных данных	116
3.8	Мутагенез для изменения каталитической активности	121
3.8.1	Мутации <i>bS1T, bS1C, bT68S, bS1T+bT68S</i>	121
3.8.2	Мутации <i>bI177V, bW154F</i>	125
3.9	Мутагенез для изменения эффективности синтеза	127
3.9.1	Мутации <i>bF24A, bF24A+bF71L, bF24A+bF71L+bF256R</i>	127
3.9.2	Мутация <i>aS149R</i>	134
3.9.3	Мутация <i>bN388Q</i>	137
3.9.4	Мутации <i>bF256R, bA255R</i>	141
3.10	Мутагенез для изменения стереоселективности.....	147
3.10.1	Мутации <i>bF71L, bF71A</i>	147
3.11	Мутагенез для изменения стабильности	154

3.11.1 Мутации <i>bQ292R, bI329E</i>	154
3.11.2 Мутации <i>bD484N, bD484H</i>	157
3.11.3 Мутация <i>bR297A</i>	163
3.11.5 Мутация <i>aA173C+bA410C</i>	166
3.11.6 Мутации <i>bR533C+bW500C, bM485R</i>	167
ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ	169
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	170
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	181
Приложение 1: «Парное выравнивание первичных аминокислотных последовательностей ПА».....	181
Приложение 2. «Праймеры».	187
Приложение 3. «Программа»	190
Приложение 4. «Биоинформатический анализ семейства ПА».....	199

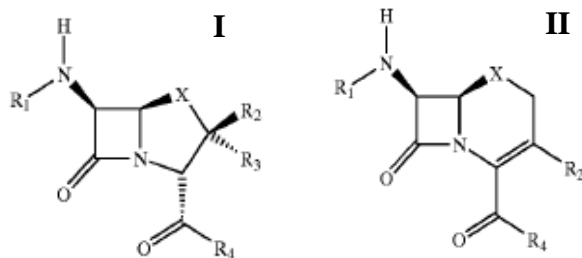
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ПА	пенициллинацилаза;
ДТ	дикий тип;
abПА	пенициллинацилаза из <i>Acinetobacter baumannii</i> ;
afПА	пенициллинацилаза из <i>Alcaligenes faecalis</i> ;
apПА	пенициллинацилаза из <i>Acetobacter pasteurianum</i> ;
asПА	пенициллинацилаза из <i>Achromobacter species</i> ;
avПА	пенициллинацилаза из <i>Arthrobacter viscosus</i> ;
axПА	пенициллинацилаза из <i>Achromobacter xylosoxidans</i> ;
bmПА	пенициллинацилаза из <i>Bacillus megaterium</i> ;
ecПА	пенициллинацилаза из <i>Escherichia coli</i> ;
kcПА	пенициллинацилаза из <i>Kluyvera citrophila</i> ;
krПА	пенициллинацилаза из <i>Kluyvera cryocrescens</i> ;
prПА	пенициллинацилаза из <i>Providencia rettgeri</i> ;
slПА	пенициллинацилаза из <i>Streptomyces lavendulae</i> ;
smПА	пенициллинацилаза из <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ;
ttПА	пенициллинацилаза из <i>Thermus thermophilus</i> ;
xcПА	пенициллинацилаза из <i>Xanthomonas citrii</i> ;
pdЦА	цефалоспориноцилаза из <i>Pseudomonas diminuta</i> ;
АГЛА	ацил-гомосеринлактон ацилазы;
ГА	глутарил-7-АЦК ацилазы;
Пен-Г	пенициллин-Г;

НІРАВ	м-карбокси-п-нитроанилид ФУК;
НІРГВ	м-карбокси-п-нитроанилид D-ФГ;
ФМСФ	фенилметилсульфонил фторид;
ФУК	фенилуксусная кислота;
ФАА	фенилацетамид;
ФОУК	феноксиуксусная кислота;
D-ФГ	D-фенилглицин;
п-ОН-D-ФГ	пара-гидрокси-D-фенилглицин;
D-2,5-дФГ	D-2,5-дигидрофенилглицин;
ТЗУ	тетразолилуксусная кислота;
МК	миндальная кислота;
ААК	α -аминоадипиновая кислота;
6-АПК	6-аминопенициллановая кислота;
7-АЦК	7-аминоцефалоспоровая кислота;
7-АДЦК	7-аминодезацетоксицефалоспоровая кислота;
7-ПАЦК	L-пропенил-7-АЦК (для формулы II: R2=L-пропенил);
MT-7-АЦК	3-(5-метил-1,3,4-тиодиазол-2-ил)-7-АЦК;
7-АХЦК	7-амино-3-хлороцефем-4-карбоновая кислота;
7-АПРА	(6R,7R)-7-амино-8-окси-3-(1-пропиенил)-5-тио-1-азабицикло[4.2.0]окто-2-ен-2-карбоновая кислота;
2-АБ	2-аминобутанол;
ФА	фенилаланинол;

ФФА	фенилацетилфенилаланинол;
МФА	R-манделилфенилаланинол;
ОФА	о-фталиевый альдегид;
R-NMC	N-(R)-манделил-(S)-цистеин;
РСА	рентгеноструктурный анализ;
ПЦР	полимеразная цепная реакция;
dNTP	дезоксирибонуклеозид трифосфаты;
SDS	додецилсульфат натрия;
IPTG	изопропил-бета-D-1-тиогалактопиранозид;
ФБ	фосфатный буфер;
э.и. ^{50%}	рассчитанное значение энантиомерного избытка (э.и.) при 50% конверсии;
п/гр	подгруппа;
н.а.	нет активности;
н.д.	нет данных;

бета-лактамный антибиотик - термин объединяющий все антибиотики, представленные формулами I (пенициллины) и II (цефалоспорины):



где X=S, O, C или SO₂, R1 - боковой радикал, например, остаток ФУК, ФОУК, D-ФГ, П-ОН- D-ФГА или D-2,5-дигидро-ФГ и их производные, а также ацетил, адипил или глутарил и их производные, R2 и R3=Cl, алифатический или ароматический радикал, дополнительно может

включать атомы O, S или N, R4 = OH, алифатический или ароматический спирт и возможные производные, дополнительно может включать атомы O, S или N.

epPCR	error-prone PCR (склонный к ошибкам ПЦР);
SSM	site saturation mutagenesis (сайт-насыщающий мутагенез);
CAST	combinatorial active-site saturation test (комбинаторный насыщающий тест по акт. сайту). Не путать с вариантом названия методики SELEX (cyclic amplification and selection of targets);
ISM	iterative saturation mutagenesis (итеративный насыщающий мутагенез);
ProSAR	protein sequence activity relationships (взаимосвязь белок-последовательность-активность).

Сокращения, характеризующие изменение свойств мутанта по отношению к есПА ДТ:

ОИ относительное изменение того или иного свойства, зафиксированное в той или иной реакции;

ОИ_{конв} отношение максимальных степеней превращения (%) β-лактамной части;

ОИ_{кат} относительное изменение каталитической активности;

ОИ_{S/H} относительное изменение соотношения начальных скоростей синтеза и гидролиза;

ОИ_{ин} относительное изменение константы инактивации первого порядка.

В скобках приводятся уточнения или особые условия при которых зафиксировано ОИ. Например, «ОИ_{конв}=31/30 (ац.донор)», означает что % конверсии рассчитан по расходу ацильного донора. Если не оговорено иное, изменение зафиксировано относительно есПА.

Рассматриваемые реакции, катализируемые ПА:

Реакция пG: Гидролиз пенициллина-G с образованием 6-АПК и ФУК;

Реакция цG: Гидролиз цефалоспорино-G с образованием 7-АДЦК и ФУК;

Реакция цС: Гидролиз цефалоспорино-С с образованием 7-АЦК и ААК;

Реакция пV: Гидролиз пенициллина-V с образованием 6-АПК и ФУОУК;

Реакция 0a: Синтез Пен-G путем ацилирования 6-АПК амидом ФУК;

Реакция 1a: Синтез ампициллина путем ацилирования 6-АПК амидом D-ФГ;

Реакция 1э: Синтез ампициллина путем ацилирования 6-АПК эфиром D-ФГ;

Реакция 2a: Синтез амоксициллина путем ацилирования 6-АПК амидом п-ОН-D-ФГ;

Реакция 2э: Синтез амоксициллина путем ацилирования 6-АПК эфиром п-ОН-D-ФГ;

Реакция 3a: Синтез цефалексина путем ацилирования 7-АДЦК амидом D-ФГ;

Реакция 3э: Синтез цефалексина путем ацилирования 7-АДЦК эфиром D-ФГ;

Реакция 4a: Синтез цефадросила путем ацилирования 7-АДЦК амидом п-ОН-D-ФГ;

Реакция 4э: Синтез цефадросила путем ацилирования 7-АДЦК эфиром п-ОН-D-ФГ;

Реакция 5a: Синтез цефрадина путем ацилирования 7-АДЦК амидом D-2,5-дФГ;

Реакция 5э: Синтез цефрадина путем ацилирования 7-АДЦК эфиром D-2,5-дФГ;

Реакция 6э: Синтез цефпродина путем ацилирования 7-ПАЦК эфиром D-ФГ;

Реакция 7: Синтез цефалотина путем ацилирования 7-АЦК тиенилуксусной кислотой;

Реакция 8: Синтез цефазолина путем ацилирования МТ-7-АЦК эфиром ТЗУ;

Реакция 9э: Синтез цефаклора путем ацилирования 7-АХЦК эфиром D-ФГ;

Реакция 10э: Синтез цефпрозила путем ацилирования 7-АПРА эфиром п-ОН-D-ФГ;

(Эфир метиловый, этиловый, гидроксипропиловый).

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Пенициллинацилаза из *Escherichia coli* (есПА) широко используется в фармацевтической промышленности для получения ядер бета-лактамных антибиотиков путем гидролиза природных пенициллинов и цефалоспоринов [1; 2]. 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. [3; 4]. Однако ограниченная субстратная специфичность и стереоспецифичность фермента дикого типа, осложнение реакций синтеза протеканием побочных реакций гидролиза, низкая стабильность в щелочной среде, а также 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. Основной 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 для улучшения 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 6-аминопенициллановой кислоты в реакции синтеза бета-лактамных антибиотиков; введение мутации bF71A приводит к 250-кратному увеличению стереоселективности в реакции ацилирования ароматических аминоспиртов. 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 щелочной среде, 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 аминоспиртов, а также эффективностью ацилирования ароматических и алифатических аминоспиртов.

Практическая значимость работы. Оптимизирована и внедрена в лабораторную практику методика получения генов мутантных форм есПА. Создана коллекция, включающая тридцать три новые плазмиды (в том числе девять получены к.х.н. Ясной А.С.), содержащие гены мутантных форм есПА. Получены, выделены и очищены двадцать семь новых активных мутанта есПА. 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 свое 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 аминспирта и получить индивидуальные энантимеры 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, 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.

1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 Пенициллинацилаза

1.1.1 Общие сведения

Пенициллинацилаза (ПА, КФ 3.5.1.11) относится к классу гидролаз, подклассу амидогидролаз и, в основном, известна как катализатор гидролиза амидной связи в антибиотиках пенициллинового ряда. ПА широко распространены в различных микроорганизмах, включая бактерии, грибы и дрожжи. В настоящее время наиболее изученной является ПА из *Escherichia coli* (есПА).

1.1.1.1 Физиологическая роль ПА

В работах [5–8], посвященных в той или иной степени прояснению физиологической роли ПА, было установлено, что ФУК, способная выступать в качестве единственного источника углерода, индуцирует активность ПА в клетках на транскрипционном уровне. Наряду с этим ген ПА (*PAC*) обладает некоторыми регуляторными особенностями, свойственными многим генам, принимающим участие в метаболизме углерода. Учитывая подобные факты, в качестве рабочей гипотезы принимается предположение, что ПА вовлечена в ассимиляцию ароматических соединений - источников углерода у непаразитических организмов [9]. Roa A. с соавторами приписали ПА роль молекулярного «дворника», трансформирующего неметаболизируемые фенилацетилированные субстраты в метаболизируемые [10]. Однако, к сожалению, современные комплексные работы по данной тематике отсутствуют, и вопрос о роли ПА *in vivo* до сих пор остается открытым.

1.1.1.2 Каталитическая активность

Впервые гидролитическая активность ПА была обнаружена японскими учеными в 1950 г. [11]. ПА катализирует реакцию гидролиза Пен-Г с образованием 6-АПК и ФУК (рис.1)

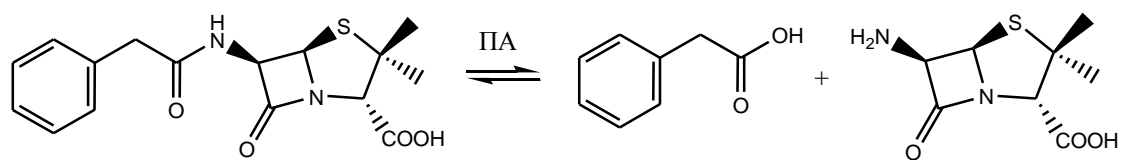


Рис 1. Ферментативный гидролиз Пен-Г, катализируемый ПА.

Уникальность свойств ПА заключается в том, что фермент избирательно катализирует расщепление амидной связи в боковой цепи Пен-Г, не затрагивая более лабильную лактамную связь. Это преимущество фермента нашло широкое применение при получении ядер бета-лактамовых антибиотиков (6-АПК, 7-АДЦК) из природных пенициллинов. Следует особо отметить, что катализ ПА происходит в исключительно мягких условиях в водной среде. Температурный оптимум лежит в диапазоне 35-38 °С, рН оптимум приходится на 7,6-8,5 [12; 13].

Синтетическая активность ПА была обнаружена 10 лет спустя в 1960 г. [14; 15]. Авторы продемонстрировали возможность получения Пен-Г обратно из 6-АПК и ФУК. Синтетические способности ПА открывают путь для получения целого ряда полусинтетических бета-лактамовых антибиотиков (см. п. 1.1.2.1, а также реакции на стр.9-10). Принципиальным отличием реакции гидролиза пенициллинов и цефалоспоринов является ее обратимость, что делает возможным препаративный биокаталитический синтез новых так называемых полусинтетических аналогов в водной среде [16].

1.1.1.3 Субстратная специфичность

Субстратная специфичность есПА (класс Па, согласно [17]) главным образом определяется строением ацильной части (рис.2). Наиболее специфичными субстратами являются эфиры и амиды ФУК, в том числе Пен-Г ($k_{cat} = 39-50 \text{ с}^{-1}$, $K_M = 5-10 \text{ мкМ}$, рис. 2), который до появления работы [18] считался наиболее реакционноспособным субстратом. В одной из ранних работ [19] авторы предложили ферменту название «фенилацетилаза».

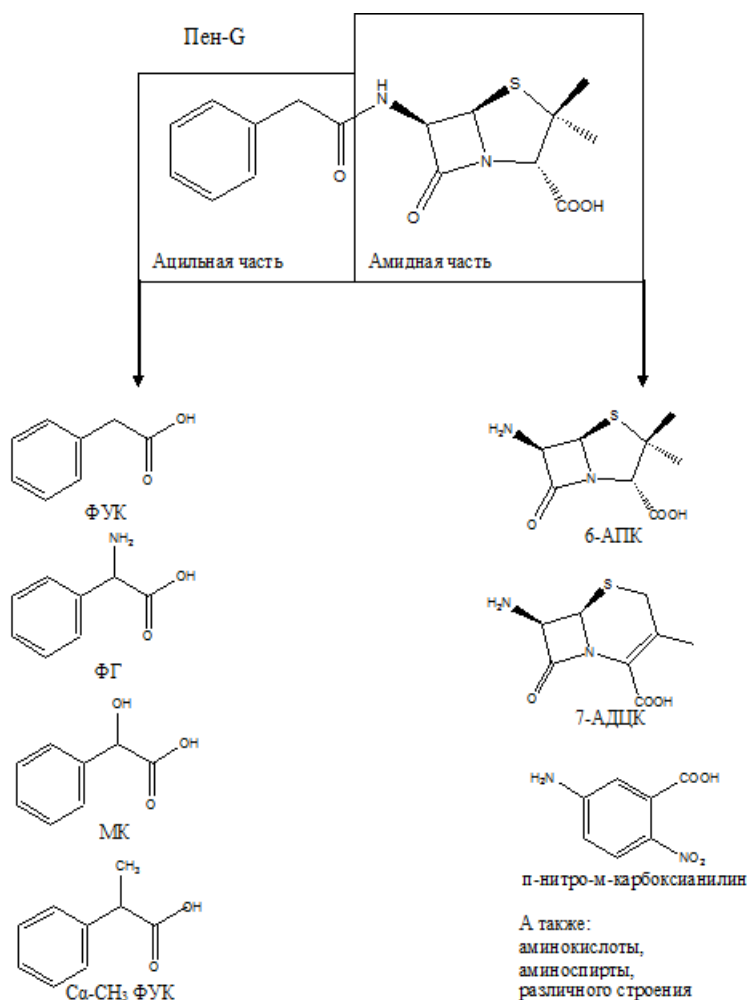


Рисунок 2. Субстратная специфичность есПА.

Субстратная специфичность ПА к ацильной части строго ограничена и допускает возможность присутствия лишь небольших заместителей в *Sa* положении фенилацетильной части или в ароматическом кольце. Марголин А.Л., Швядас В.К. и Березин И.В. в работе [20] показали, что, в то время как k_{cat} гидролиза фенилацетильных производных и производных D-ФГ отличаются в незначительной мере, значения K_M в случае производных D-ФГ примерно на 2 порядка выше, чем в случае соответствующих фенилацетильных производных. Фермент не способен связывать ацильный остаток, содержащий протонированную аминогруппу. Специфичность ПА к амидной части широкая – ферментативный гидролиз N-ацильных производных широкого круга аминосоединений, в том числе аминокислот, олигопептидов, сахаров и нуклеозидов, протекает эффективно. Было также обнаружено, что при переходе от Пен-Г к фенилацетильным производным некоторых аминокислот и фенилацетиланилидов k_{cat} также меняется слабо, и в большинстве случаев значительно повышается значение K_M

[20]. Высокая специфичность к фенилацетильной части позволяет использовать такие «цветные» субстраты как NIPAB для определения активности препаратов фермента разной степени очистки [21; 22]. Тем не менее изменение структуры уходящей группы может сильно сказываться и на значении k_{cat} : при переходе от цефалексина к п-нитроанилиду D-ФГ каталитическая константа уменьшается в 100 раз при том, что значение K_M одинаково для двух субстратов.

1.1.1.4 Стереоспецифичность

Первые указания на энантиоизбирательность ПА были получены при проведении гидролиза фенилацетильных производных альфа-аминокислот. Cole M. показал, что L-энантиомеры фенилацетильных производных аминокислот гидролизуются есПА быстрее, чем соответствующие D-формы субстрата [19]. Значение стереоспецифичности гидролиза фенилацетильных производных альфа-аминокислот достигает значений от нескольких сотен до нескольких тысяч в зависимости от структуры бокового радикала аминокислоты [18; 23]. Гораздо менее эффективно есПА различает энантиомеры ацильных производных нефункционализированных аминов и соединений, содержащих спиртовую группу.

Галунский Б. с соавторами изучили стереоспецифичность ПА из разных источников по отношению к ряду субстратов, представляющих практический интерес [24]. Было показано, что при наличии хирального центра в ацильной части субстрата наблюдается избирательное превращение R-форм, а в случае наличия хирального центра в амидной части – S-форм (рис.3).

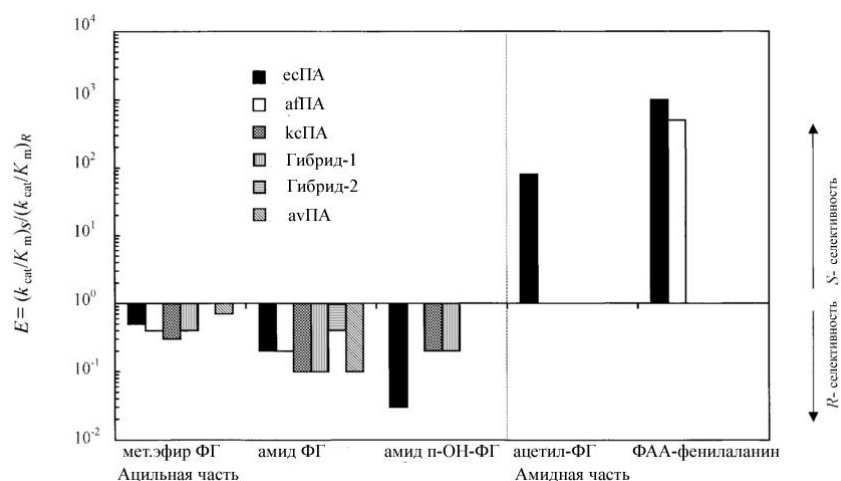


Рис.3 Стереоселективность ПА из различных источников по отношению к субстратам, содержащим хиральный центр в ацильной и амидной частях субстрата.

1.1.2 Основные области применения ПА

1.1.2.1 Получение бета-лактамовых антибиотиков

В настоящее время для получения полусинтетических бета-лактамовых антибиотиков широко используют методы тонкого органического синтеза – синтез из хлорида D-ФГ•HCl по Шоттен-Бауману (рис.4 слева) и синтез через образование соли Дана и смешанного ангидрида (рис.4 справа).

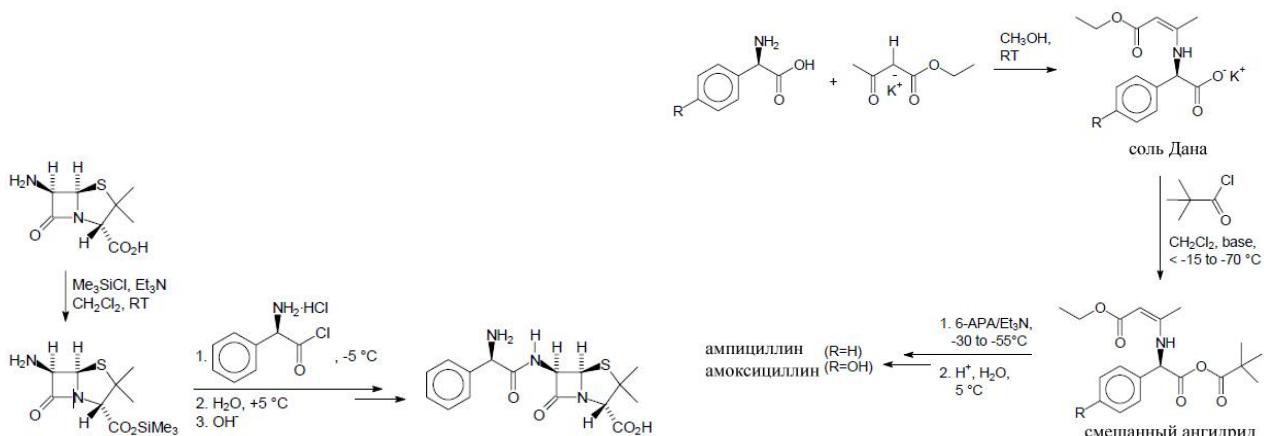


Рис.4 Химический синтез ампициллина по Шоттен-Бауману (слева) и по Дану (справа).

Как видно из рис.4, многостадийный химический синтез требует введения защитных групп, использования галогенированного растворителя, пониженных температур и сопровождается большим числом побочных продуктов. Несмотря на это, еще 10 лет назад у химического синтеза не было реальной экономически оправданной альтернативы. Разработкой одностадийного биокаталитического синтеза при помощи ПА занимались многие научные коллективы, начиная с открытия в 60-х годах прошлого века синтетических способностей фермента [15; 16; 25–29]. Опытное биокаталитическое производство цефалексина было организовано в СССР на Рижском заводе медицинских препаратов в середине 80-ых годов. В 2004 г. компания DSM (Нидерланды) анонсировала открытие масштабного производства «ферментативного» цефалексина, цефадроксила и амоксициллина [30]. Использование иммобилизованных препаратов ПА позволяет производить одностадийный ферментативный синтез в исключительно мягких условиях в водной среде.

Ферментативный синтез бета-лактамных антибиотиков, как, впрочем, любых амидов, можно проводить в термодинамически (обратный гидролиз) и кинетически контролируемых режимах (рис.5).

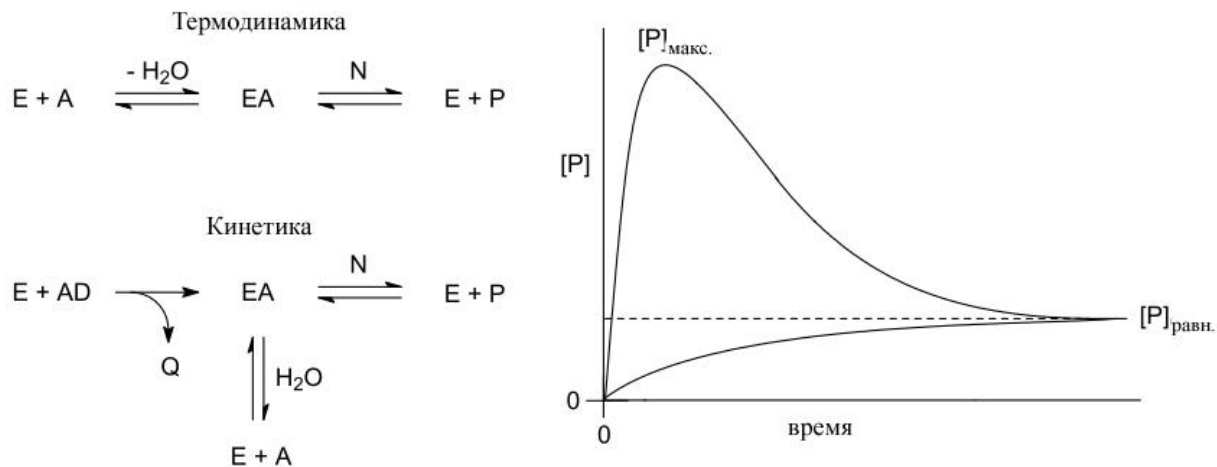


Рисунок 5. Упрощенные кинетические схемы и кривые накопления антибиотика (P) для катализируемого ПА (E) термодинамически и кинетически контролируемого синтеза. А – свободная аминокислота, AD – активированное производное аминокислоты, N – бета-лактамный нуклеофил, EA – ацил-фермент, Q – уходящая группа.

В первом случае при прямой конденсации производных ФУК (А) и бета-лактамного ядра (N) максимальный выход продукта равен равновесному, определяется константой равновесия и не зависит от свойств фермента:

$$[P]_{\text{макс.}} = [P]_{\text{равн.}} = \frac{[A][N]}{K_p \cdot [H_2O]}.$$

Данный подход может быть с успехом реализован при использовании ФУК или тиенилуксусной кислоты в качестве донора ацильной части для синтеза Пен-Г и цефалотина [15; 28; 31], однако, не подходит для синтеза антибиотиков, содержащих аминогруппу в боковой цепи (ампициллина, амоксициллина, цефалексина и др.) из-за цвиттерионной природы ацильного донора (ФГ, п-ОН-ФГ) в широком диапазоне рН.

В кинетически контролируемом режиме, когда происходит перенос ацильной группы от активированного донора (сложных эфиров, амидов, N- ацилированных аминокислот), максимально достижимая концентрация продукта обычно превышает равновесную (рис.5), что делает данный подход более привлекательным. Экспериментальные исследования кинетики реакции ацильного переноса показывают, что реакция описывается схемой 1 [32]:

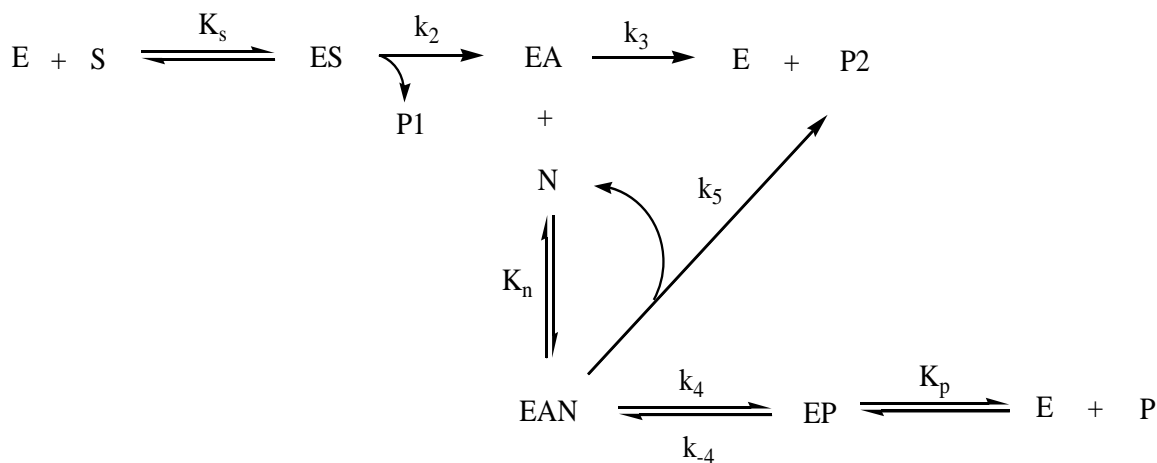


Схема 1. «Минимальная» кинетическая схема ферментативного переноса ацильной группы на нуклеофил. E – свободный фермент, S – активированный донор ацильной части, P1 – продукт гидролиза донора, P2 – продукт гидролиза ацилферментного комплекса, N – нуклеофил, P – целевой продукт, ES – фермент-субстратный комплекс, EA – ацилфермент, EP – комплекс фермент-продукт, EAN – ацилфермент-нуклеофильный комплекс.

Процесс протекает через последовательное образование ацилферментного (EA) и ацилфермент-нуклеофильного комплекса (EAN), который в свою очередь подвергается трансформации и приводит к образованию продукта (P). В теоретических работах [32–34] по кинетике ацильного переноса, катализируемого ферментами, действующими по данной схеме, показано, что при фиксированных начальных концентрациях ацильного донора (S_0) и нуклеофила (N_0) максимальный выход целевого продукта зависит только от значений трех ключевых параметров:

- параметра $\alpha=(k_{-4}/K_P)/(k_2/K_S)$, характеризующего относительную специфичность фермента по отношению к продукту (P) и исходному ацильному донору (S).
- параметра $\beta=k_4/(k_3 \cdot K_N)$, характеризующего относительную реакционную способность нуклеофила (N),
- параметра $\gamma=k_5/k_4$, характеризующего способность тройного комплекса EAN превращаться по гидролитическому или синтетическому пути.

Конкурирующие реакции непродуктивного гидролиза ацильного донора (k_3) и образующегося антибиотика (k_{-4}) – основные недостатки кинетически контролируемого синтеза бета-лактамных антибиотиков. Одним из принципиальных подходов для устранения данных недостатков и увеличения выхода является оптимизация условий проведения синтеза.

Чтобы уменьшить негативное влияние воды, как нуклеофила, конкурирующего за ацилфермент наряду с акцептором ацильной части, Юшко М.И. и Швядас В.К. предложили проводить реакцию в твердофазной системе [35]. Было показано, что эффективность синтеза ампициллина сильно возрастает при уменьшении содержания воды в системе (рис.6А), а также при увеличении количества внесенной иммобилизованной пенициллинацилазы (рис.6Б).

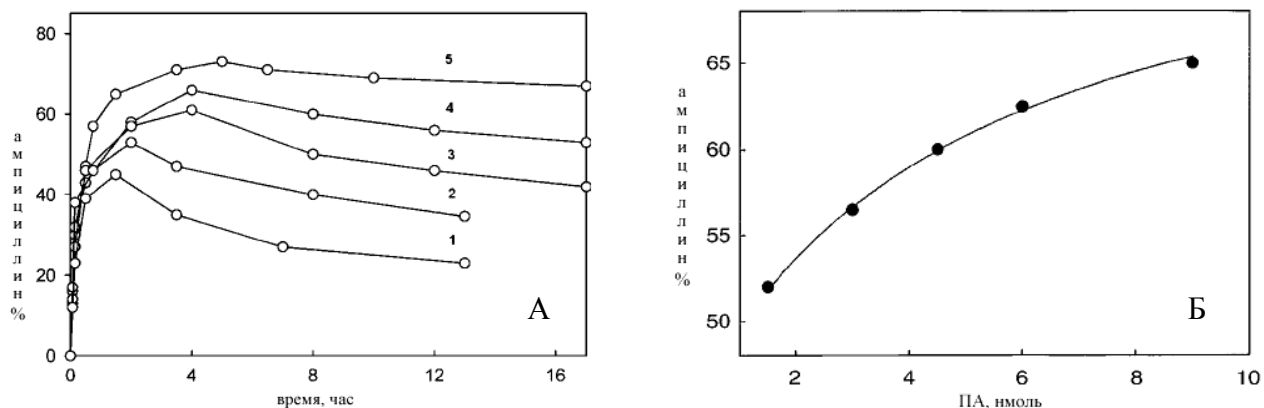


Рисунок 6. А: Накопление ампициллина в твердофазном режиме синтеза, катализируемого ПА. Содержание воды: 1-35%, 2-30%, 3-20%, 4-15%, 5-10%. Б: Зависимость максимального выхода ампициллина от количества иммобилизованной ПА в системе.

В работе [36] Юшко М.И. с соавторами воплотили идею использования эффектов кинетического пересыщения системы по отношению к исходным субстратам. При этом для гомогенной пересыщенной системы 6-АПК/амид D-ФГ удалось добиться увеличения выхода по сравнению с твердофазной. Улучшения эффективности ацильного переноса можно также достигнуть при использовании техники рН-градиента [37; 38]. Для этого реакцию начинают при рН 7, благодаря чему достигается хорошая растворимость 6-АПК, а по мере протекания реакции и, следовательно, расходования 6-АПК, раствор плавно подкисляют (до рН 6.3), сдвигая термодинамическое равновесие в сторону синтеза, при этом концентрация 6-АПК всегда близка к насыщающей. Еще одним способом, повышающим эффективность синтетического процесса, является техника, в которой активированный донор и нуклеофил добавляются по ходу их расходования, при этом концентрация нуклеофила поддерживается на уровне насыщения [37; 39]. Показано, что при использовании полунепрерывного режима проведения реакции эффективность синтеза может быть увеличена до практически количественного выхода по 6-АПК и 85% по донору.

Существует также ряд методов, основанных на внесении в реакционную среду различных органических соединений. Внесение таких веществ, как диметилсульфоксид, диметилформамид, глицерин, бутандиол, вызывает заметное изменение значений рКа ионизации функциональных групп [40; 41], что наряду с внесением в систему веществ понижающих активность воды, таких как сорбит, глицерин, сахароза [42; 43], позволяет заметно повысить выход целевого продукта. Есть данные, что при оптимальном содержании метанола в системе (50-60%) выход Пен-Г удастся увеличить в 8 раз, однако полученный

эффект представляет скорее научный, а не практический интерес (увеличение выхода с 3,8 до 31%)[44]. Увеличения выхода также можно достичь при проведении реакции в двухфазной среде путем экстракции целевого соединения в органическую фазу. Например, при проведении реакции в двухфазной системе хлороформ-вода (1об.%) выход Пен-Г увеличивается с 10 до 60% по сравнению с реакцией в водной среде [45].

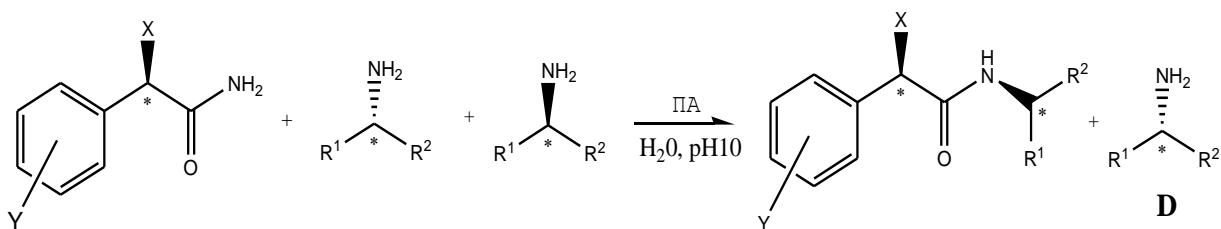
Несмотря на ряд преимуществ, реальное применение данных методов весьма ограничено. Использование описанных техник требует существенного усложнения системы, а использование различных органических добавок сказывается на стабильности биокатализатора и требует введения дополнительных стадий выделения и очистки. Альтернативным решением проблемы может быть использование более эффективного катализатора. В отличие от термодинамически контролируемого синтеза, в кинетически контролируемом свойства фермента влияют на выход целевого продукта. В связи с этим получение катализатора с улучшенными кинетическими характеристиками представляет большой практический интерес (см. раздел 1.2).

1.1.2.2 Разделение энантиомеров аминсоединений

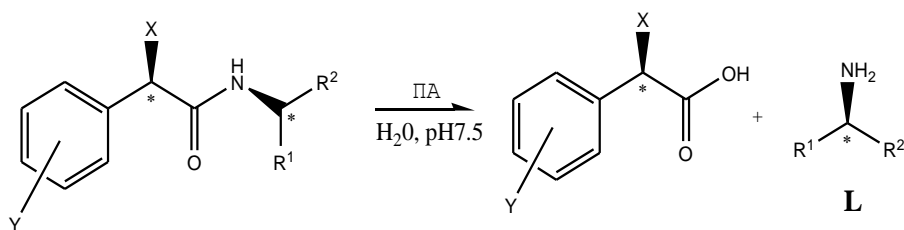
Другим актуальным и перспективным направлением использования ПА в промышленно значимых областях является получение энантиомерно чистых аминсоединений.

В работе [46] было впервые проведено высокоэффективное биокаталитическое ацилирование аминсоединений в водной среде. Было показано, что катализируемое аfПА стереоселективное ацилирование аминсоединений, содержащих ароматические группы, в отличие, например, от ацилирования в органических средах липазами [47], протекает чрезвычайно быстро с высокой хемоселективностью, а образующийся продукт может быть впоследствии деацилирован тем же ферментом. Обе стереоселективные стадии – ацилирование и деацилирование могут быть объединены в единый интегральный биокаталитический метод разделения энантиомеров аминсоединений, использующий весь каталитический потенциал аfПА, где на первой стадии проводится исчерпывающее ацилирование активного L-энантиомера в рацемате аминсоединения и после отделения незатронутого D-антипода на второй стадии проводится гидролиз N-ацильного производного с образованием свободной L-формы:

1. Стереоселективное ацилирование :



2. Стереоселективный гидролиз:



Обе реакции, катализируемые аfПА, проходят в водных растворах с высокой эффективностью. По сравнению с разделением энантиомеров, основанном на одном биокаталитическом превращении, метод, сочетающий две последовательные ферментативные реакции, позволяет получить оба энантиомера и обеспечивает двойной контроль энантиоселективности. Природный катализатор есПА эффективен для получения оптически чистых аминокислот, что основано на высокой стереоспецифичности к этому классу аминосоединений. Однако, для аминспиртов и аминов, содержащих алифатические группы, стереоспецифичность есПА и аfПА на порядки ниже [48]. В связи с этим получение катализатора с улучшенной стереоспецифичностью к данным соединениям представляет большой практический интерес.

1.1.3 Структурно-функциональные особенности есПА

1.1.3.1 Структура предшественника

Зрелый фермент есПА – это периплазматический гетеродимер с молекулярной массой 86 кДа, состоящий из α - и β -цепей (209 и 566 аминокислот, соответственно) [9]. Обе субъединицы фермента образуются из общего предшественника (рис.7) в результате автокаталитического посттрансляционного созревания [49].

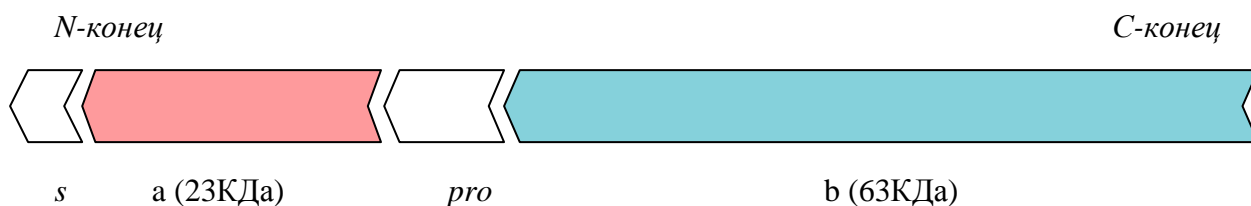


Рисунок 7. Предшественник есПА.

Сигнальная последовательность (s) состоит из 26 аминокислот и предназначена для прямого транспорта предшественника в периплазму, а 54-аминокислотный участок между α - и β -цепями (pro) влияет на окончательное сворачивание цепей. Также известно, что ион Ca^{2+} , присутствующий в структуре белка, способствует процессингу [50].

1.1.3.2 Активный центр

Первый рентгеноструктурный анализ ПА был проведен в 1995 году для есПА с разрешением в $1,9 \text{ \AA}$ (1pnk) [9]. Согласно полученным данным, гетеродимер имеет усредненные размеры $70 \times 50 \times 55 \text{ \AA}$ и состоит из двух тесно переплетенных цепей, формирующих типичный $\alpha\beta\alpha$ мотив укладки и образующих пирамидальную структуру с глубокой чашеобразной выемкой, на дне которой находится активный центр (рис.8).

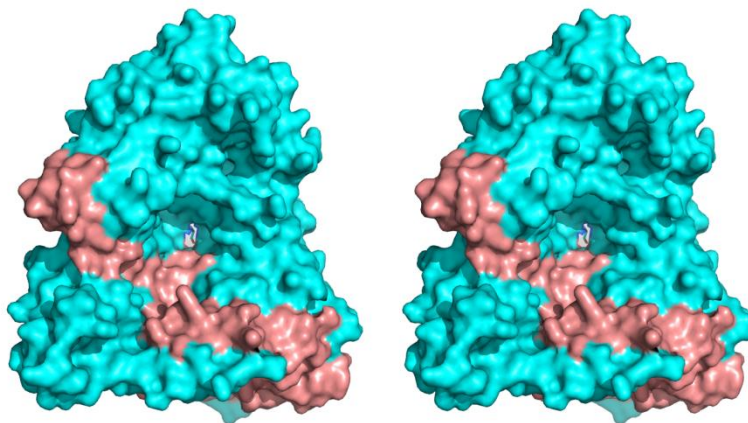


Рисунок 8. Трехмерная структура ПА (стереоизображение). α -субъединица показана красным цветом, β -субъединица – синим.

В ранних работах по изучению ПА было показано, что ключевую роль в катализе играет остаток серина, ковалентная модификация которого при помощи ФМСФ приводит к полной потере ферментом каталитической активности [51]. Данные РСА по ковалентному комплексу есПА с ФМСФ (1рnm) [50] уточнили, что этим ключевым остатком является N-концевой серин β -цепи. Тем не менее, вблизи остатка β S1 нет групп (H, E, D), которые обычно присутствуют в активном центре сериновых протеаз и принимают участие в каталитических актах ацилирования и деацилирования посредством переброса протона по образуемой ими цепочке сопряженных кислот и оснований. Их роль выполняет собственная аминогруппа серина, что дало основание отнести ПА к классу так называемых гидролаз с N-концевым нуклеофилом или Ntn-классу (N-terminal nucleophile) [52].

1.1.3.3 Механизм катализа

Механизм модельной реакции, исследованный Чиловым Г.Г. с соавторами методами квантовой механики, можно описать следующим образом [53]. Атака атома O^γ N-концевого серина по карбонильному атому углерода субстрата может сопровождаться передачей протона с гидроксильной группы на собственную α -аминогруппу. Образующийся при этом оксианион может стабилизироваться взаимодействием с амидной группой β N241 и атомом азота полипептидного остова, принадлежащему β A69. Далее протон, акцептированный аминогруппой серина, может передаваться по той же самой цепочке на уходящую группу. QM/MM моделирование полного каталитического цикла гидролиза ПенG под действием

есПА показало [54], что α -аминогруппа N-концевого каталитического β S1 действительно участвует в прямой передаче протона на основных каталитических стадиях и совместно с остатками оксианионного центра β A69 и β N241, а также остатками β R263 и β Q23 образует систему взаимодействий, приводящих к стабилизации тетраэдрических интермедиатов, переходных состояний, ориентации субстрата и аминокислотных остатков активного центра фермента. Остатки β R263 и β Q23 обеспечивают целостность каталитического механизма: β R263 участвует в ориентации субстрата, а также α -аминогруппы β S1 и координирует остаток оксианионного центра β N241 в ходе всего каталитического цикла, в то время как основная цепь β Q23 отвечает за ориентацию как β S1, так и субстрата. Таким образом была получена важнейшая информация о ранее неизвестной способности N-концевого аминокислотного остатка в Ntn-гидролазах, и есПА в частности, напрямую активировать нуклеофильную группу без участия дополнительной молекулы воды. Предполагаемый механизм катализа представлен на схеме 2. Интересно отметить, что в представлении РСА предполагалось участие молекулы воды в цепи переноса протона [9].

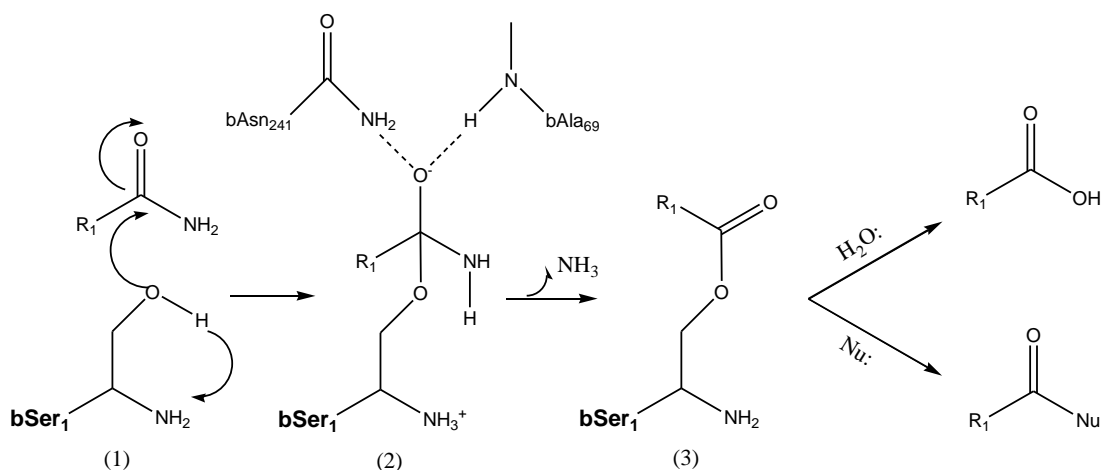


Схема 2. Каталитический механизм с участием N-концевого серина [54]. На рисунке представлены 1- свободный фермент, 2 - тетраэдрический интермедиат, 3 - ацилфермент. Показаны также два возможных пути превращения ацилфермента: деацилирование, с участием воды, и ацилирование, с участием нуклеофила (Nu:).

1.1.3.4 Конформационные переходы в активном центре.

В работах [55; 56] был проведен РСА комплексов есПА с различными лигандами. Сравнение карт электронной плотности фермент-лигандных комплексов и исходного белка свидетельствовало о том, что пространственное расположение аминокислотных остатков ПА в свободной форме и в комплексе с рассмотренными ингибиторами мало отличается (в пределах 0.2\AA), за исключением области активного центра, находящейся в сфере с радиусом 15\AA . Таким образом, при связывании некоторых лигандов происходят конформационные изменения в активном центре ПА, и, в зависимости от структуры лиганда, два аминокислотных остатка - aF146 и aR145 - могут находиться в двух энергетически выгодных пространственных положениях – в «закрытой» конформации, где гуанидиновая группа остатка aR145 связана с карбонильным кислородом остатка bF24 и гидроксильным кислородом bY31, и в «открытой» конформации, где боковой радикал аргинина повернут в раствор (рис.9).

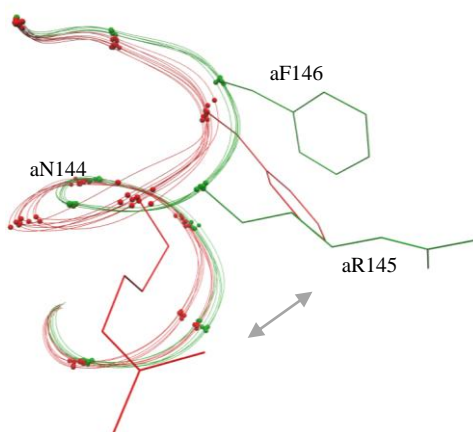


Рисунок 9. Конформации боковых радикалов остатков aR145 и aF146 в открытом (показано красным цветом) и закрытом (показано зеленым цветом) положениях. Представлено наложение спирального региона a140-a148. Точками изображены позиции C^{α} -атомов в доступных рентгеновских структурах ПА и ее комплексов с различными лигандами.

В теоретической работе [57] было показано, что смещение боковых цепей остатков aR145 и aF146 является лишь частью сложных структурных перестроек в активном центре фермента (рис.10).

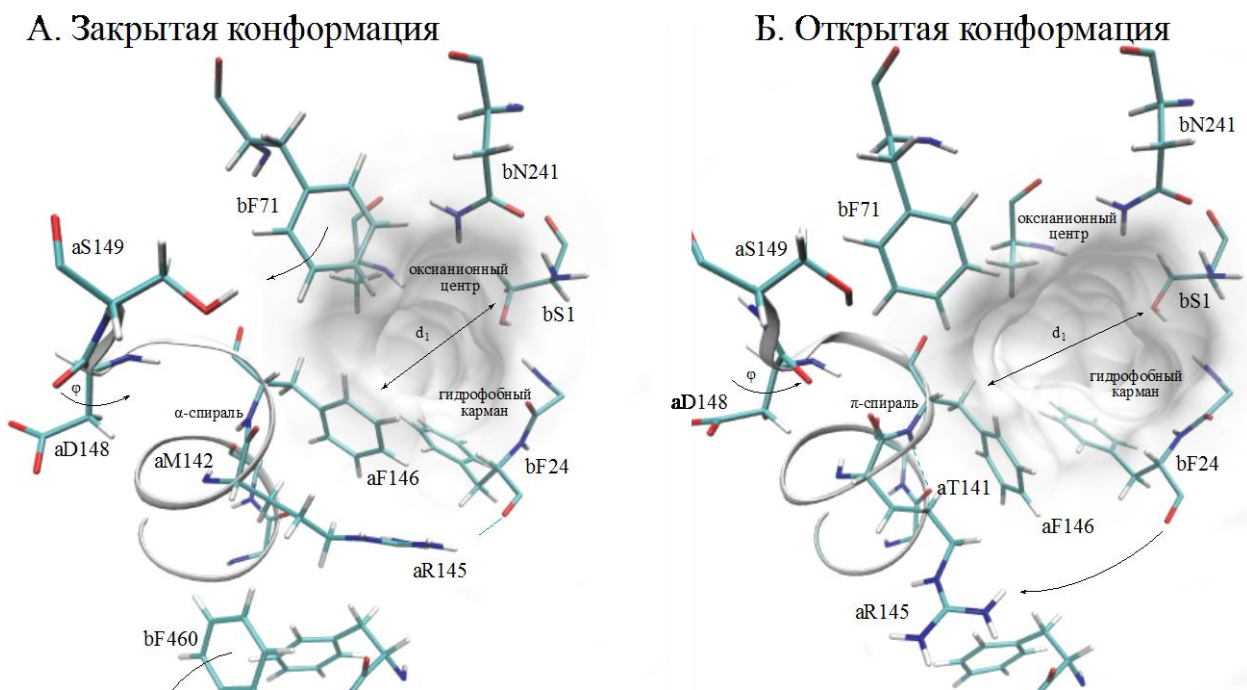


Рисунок 10. Закрытая (А) и открытая (Б) конформации есПА.

Влияние перехода из закрытой в открытую конформацию на **связывание субстратов** обусловлено тем, что остаток aF146 образует одну из стенок «гидрофобного кармана». В закрытой конформации фермента горлышко гидрофобного кармана слишком узко, чтобы позволить связаться ацильной части субстрата, однако при переходе фермента в открытую конформацию и смещении бокового радикала остатка aF146 главный диаметр увеличивается до 9 Å, что достаточно для проникновения субстрата в гидрофобный карман.

Влияние перехода из закрытой в открытую конформацию на **каталитические свойства** фермента связано с системой конформационных переходов остатков aN148, aS149, bF71 и bN241. Конформационный переход освобождает дополнительное место для бокового радикала bF71, который смещается как целое, плотно прижимаясь к спирали, что приводит к увеличению сольватно-доступной площади остатка bN241, и, как следствие, дестабилизации оксанионного центра [57].

Таким образом, в открытой конформации облегчено проникновение субстрата в активный центр, а в закрытой облегчен катализ как за счет лучшего связывания, так и за счет благоприятной геометрии.

1.1.3.5 Участок связывания ацильной части.

Аминокислотные остатки активного центра, отвечающие за связывание ацильной части субстрата и, следовательно, определяющие субстратную специфичность фермента, были установлены из РСА комплекса пенициллинацилазы с ФУК (1pnl, рис.11) [9].

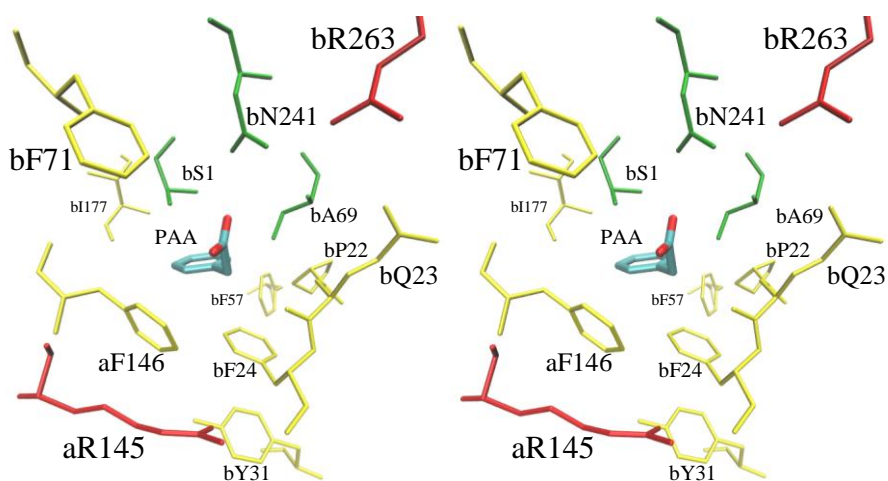


Рисунок 11. Строение гидрофобного кармана пенициллинацилазы по данным РСА (стереоизображение). Гидрофобные остатки, участвующие в связывании субстрата, показаны желтым цветом. Остатки, непосредственно участвующие в катализе (bS1, bA69, bN241) обозначены зеленым цветом. Положительно заряженные остатки (bR263 и aR145) выделены красным.

Было показано, что определяющую роль в связывании играют гидрофобные остатки, принадлежащие как а-, так и b-цепи. Стерически ограниченная гидрофобная полость в свободном состоянии имеет термодинамически невыгодный контакт с окружающей средой, и в результате гидрофобного взаимодействия субстрата с ферментом имеет место двойной выигрыш в энергии, складывающийся из энергии переноса гидрофобного субстрата из воды в гидрофобную полость фермента и выигрыша энергии за счет вытеснения воды из активного центра [21].

Так, гидрофобные взаимодействия существуют между бензольными кольцами ФУК и bF24, которые располагаются параллельно друг другу. aF146 находится на противоположной стороне гидрофобного кармана. Он также взаимодействует с ФУК, и при этом экранирует активный центр от растворителя. Еще один фенилаланин, bF57, локализован на дне полости. Наименьшее расстояние между ним и ингибитором составляет 4.7 Å, что слишком много для прямого взаимодействия. Однако этот остаток может быть важен для поддержания структуры сайта связывания, поскольку отстоит на 3.5 Å от bP22 и на 3.9 Å от bF24, которые непосредственно участвуют в связывании субстрата. Также в гидрофобном кармане присутствуют такие неполярные аминокислотные остатки, как bI177 и aM142.

1.1.3.6 Участок связывания амидной части.

При анализе рентгеноструктурных данных по комплексу пенициллина с неактивным мутантом bN241A (1fxv) [58], становится ясно, что Пен-Г на первом этапе связывается в открытой конформации, что позволяет объемной амидной части субстрата уместиться в активном центре фермента. В открытой конформации фенильное кольцо остатка bF71 оказывается в плоскости параллельной бета-лактамному кольцу. Более того, появляются Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия между метильной группой Пен-Г и C^{δ1} атомом aF146, что также усиливает связывание.

Комплекс нативного фермента с «медленным» субстратом сульфоксидом Пен-Г представляет собой фермент-субстратный комплекс непосредственно перед каталитическим актом (1gm9) [56]. Позиции остатков aR145 и aF146 в данном случае соответствуют закрытой конформации, а амидная группа bN241 образует водородную связь с карбонильным кислородом субстрата. При этом бета-лактамное кольцо сдвигается на 3.5Å по направлению к остатку bR263, который, наряду с bN388, взаимодействует с карбоксильной группой субстрата (рис.12).

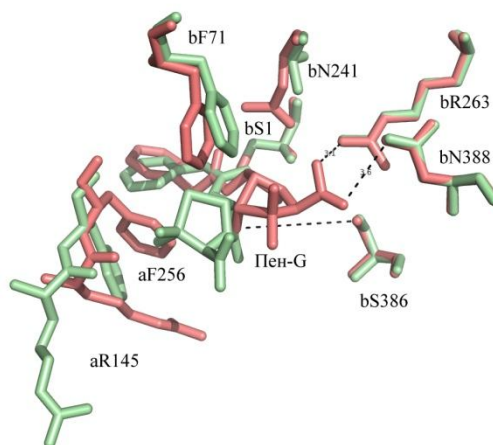


Рисунок 12. Наложение структур комплексов Пен-Г в открытой конформации (1fxv, зеленый) и сульфоксида Пен-Г в закрытой конформации (1gm9, красный) в районе активного центра.

В ходе исследования структуры фермент-субстратных комплексов с Пен-Г методами молекулярной динамики [57] было показано, что в связывании амидной части субстрата заметную роль играет также остаток bS386, который образует водородную связь с карбонильным кислородом четырехчленного цикла, а также положительно заряженный остаток aR145, взаимодействующий с карбоксильной группой субстрата опосредованно через мостиковые молекулы воды.

Мутационный анализ остатков aR145 и bR263 показал, что оба остатка существенны для катализа, а bR263 необходим также для автокаталитического созревания [59]. Изучение рН профилей активности мутантов по этим остаткам говорит о существенной роли положительного заряда гуанидиновой группы. Также полученные структурные и кинетические данные показывают, что bR263, положительный заряд которого увеличивает полярность оксианионного центра, принимает участие во всем каталитическом цикле (см. раздел 1.1.3.3). Следует отметить, что как bR263, так и aR145 консервативны и присутствуют в ПА из почти всех известных источников.

Помимо описанного продуктивного связывания субстратов в активном центре ПА в работе [60] с помощью методов молекулярного докинга и молекулярной динамики удалось обнаружить два дополнительных режима связывания – предпродуктивный и непродуктивный, которые характеризуются сравнимыми с продуктивным состоянием

энергиями связывания. Уникальным свойством предпродуктивных и непродуктивных комплексов является то, что ацильная группа субстрата не попадает в гидрофобный карман, а адсорбируется на участке активного центра между остатками bR263 и aR145.

1.1.3.7 Локализация участка связывания бета-лактамных нуклеофилов.

Определение продуктивного сайта связывания нуклеофила в ацилфермент-нуклеофильном комплексе является нетривиальной задачей из-за низкой прочности таких комплексов (оценка константы связывания нуклеофила составляет 1-10 мМ, что соответствует энергии связывания -4ккал/моль). В то же время в работе [57] с помощью определенных подходов удалось получить комплексы, стабильные в течение 10 нс. В полученных ацилфермент-нуклеофильных комплексах аминогруппа нуклеофила (6-АПК) занимает строго определенное положение, образуя водородные связи с терминальным азотом b-цепи фермента и кислородом основной цепи остатка bQ23. Эти водородные связи фиксируют аминогруппу нуклеофила в положении, благоприятном для нуклеофильной атаки: электронная пара аминогруппы нуклеофила обращается к атакуемому карбонильному атому углерода ацилфермента, и становится возможным перенос протона с аминогруппы нуклеофила на концевую аминогруппу b-цепи ацилфермента (рис.13).

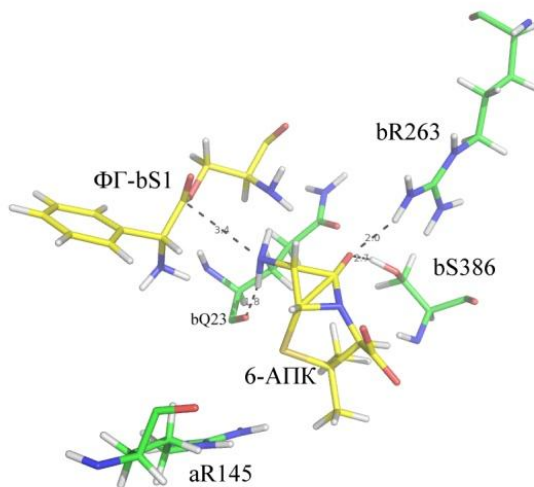


Рисунок 13. Продуктивное связывание 6-АПК в D-ФГ-ecPA.

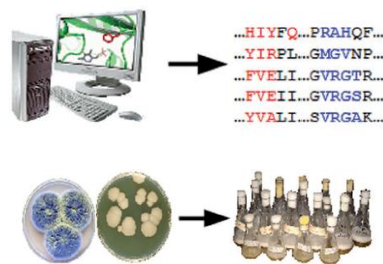
С другой стороны, такое расположение аминогруппы нуклеофила оказывается благоприятным и для связывания бета-лактамного ядра. Поскольку взаимная ориентация аминогруппы и остальной части субстрата жестко связаны, фиксация аминогруппы в активном центре фермента ведет к тому, что карбонильный кислород 4-х членного кольца и карбоксильная группа субстрата связываются в строго определенном месте, а именно, образуют водородные связи с остатками bR263, bS386.

Сравнение сайтов связывания бета-лактамного ядра в продуктивных комплексах Пен-Г и 6-АПК показывает ряд существенных различий. Если в продуктивном комплексе Пен-Г карбоксильная группа бета-лактамного ядра связывается с остатком bN388 и находится в непосредственной близости от аргинина bR263, то 6-АПК в комплексе с ацилферментом более подвижна, и ее карбоксильная группа в большей степени экспонирована в раствор, располагаясь практически на равном расстоянии от обоих положительно заряженных остатков активного центра – aR145 и bR263, при этом с остатком bR263 молекула нуклеофила образует водородную связь своим карбонильным кислородом, а остаток aR145 контактирует исключительно с гидрофобной частью 6-АПК (рис.13).

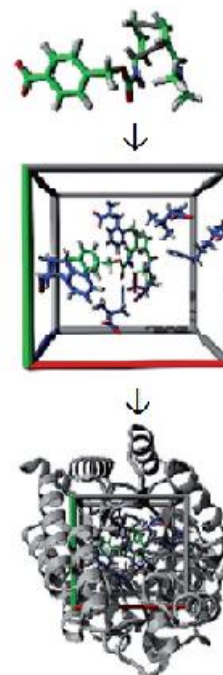
1.2. Белковая инженерия и поиск новых ПА

Несмотря на огромное число уже описанных ферментов, текущий запрос на новые биокатализаторы с измененными свойствами продолжает расти. Такие свойства ферментов, как субстратная специфичность, хемио-, регио- или энантиоселективность, термостабильность, рН профиль, операционная стабильность и др., формируют постоянный интерес со стороны биотехнологии. Для удовлетворения этого интереса и получения подходящего биокатализатора для того или иного процесса, можно выделить три основополагающие стратегии:

Во-первых, это **поиск природных биокатализаторов** с привлечением методов биоинформатики [61] или при помощи экспериментального скрининга различных коллекций штаммов [62], а также метагеномных библиотек [63–65]. В отношении ПА реализация данной стратегии представлена в разделе 1.2.1.



Во-вторых, **создание биокатализатора *de novo***, которое включает определение переходного состояния для рассматриваемой реакции, предложение активного сайта, способного стабилизировать данное состояние (QM/MM моделирование) и, наконец, встраивание активного сайта в существующий белковый каркас (например, обратный ROSETTA алгоритм [66]). Теоретически сюда же можно отнести получение биокаталитических моноклональных антител - абзимов, где на первом этапе аналогом переходного состояния выступает фосфорорганическое соединение [67; 68]



В-третьих, это улучшения каталитических свойств существующих ферментов методами **белковой инженерии**. Белковая инженерия представляет мощный инструмент для улучшения каталитических свойств фермента в реакциях, в той мере в какой они не

являются природной функцией фермента. Для этого используют подходы, которые условно можно разделить на методы случайного и направленного мутагенеза (рис.14).

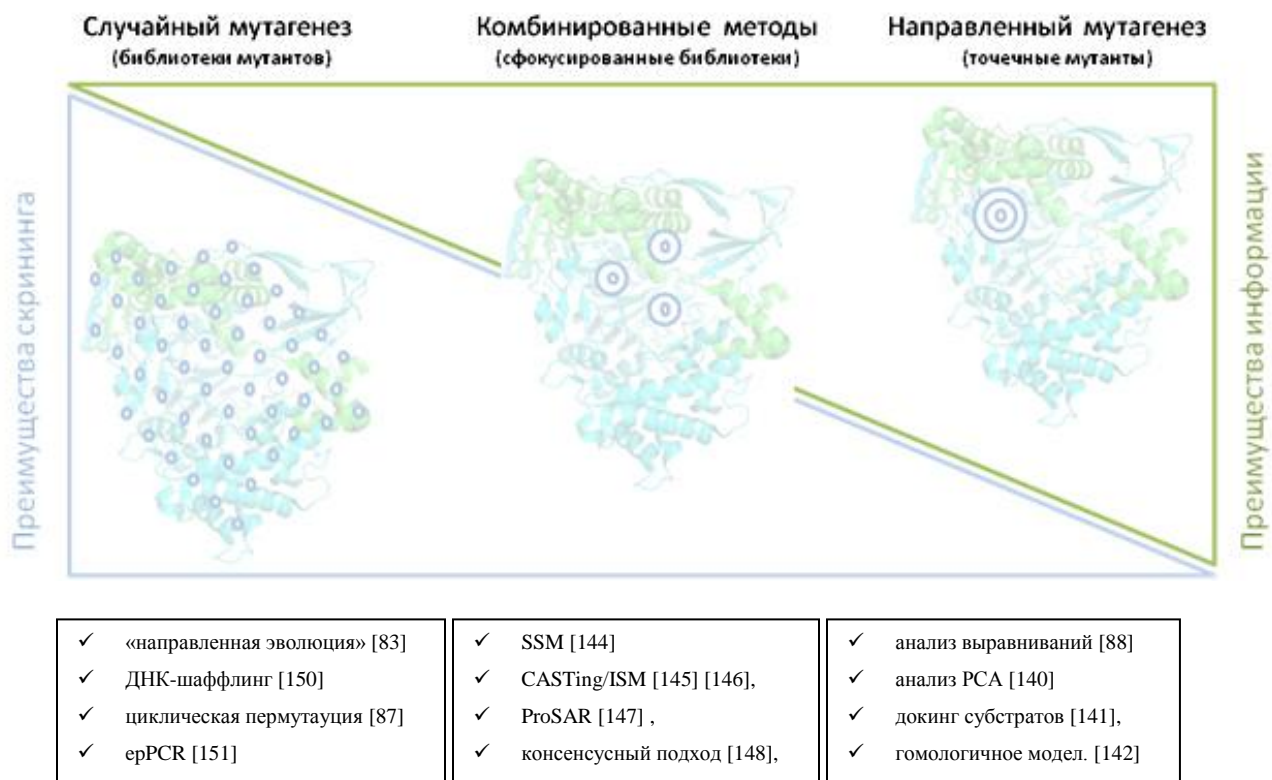


Рис.14 Методы белковой инженерии. Приведены ссылки на наиболее характерные работы.

При отсутствии или недостатке информации о структуре белка чаще прибегают к подходам случайного мутагенеза. Существенным ограничением случайного мутагенеза является необходимость наличия высокопроизводительного скрининга при изучении больших библиотек мутантов. При наличии структурной информации, но отсутствии четкого понимания структурно-функциональных связей возможно использовать комбинированные методы случайного и направленного мутагенеза, что может существенно улучшить качество и уменьшить объем изучаемой библиотеки. Непосредственно к направленному мутагенезу прибегают при высоком уровне понимания структурно-функциональных особенностей, а также при использовании методов молекулярного моделирования. В отношении ПА стратегия белковой инженерии представлена в разделе 1.2.2.

1.2.1 Поиск природных ПА

В настоящее время известны ПА из более чем 40 бактерий. Филогенетическое дерево для некоторых из них представлено на рисунке 15.

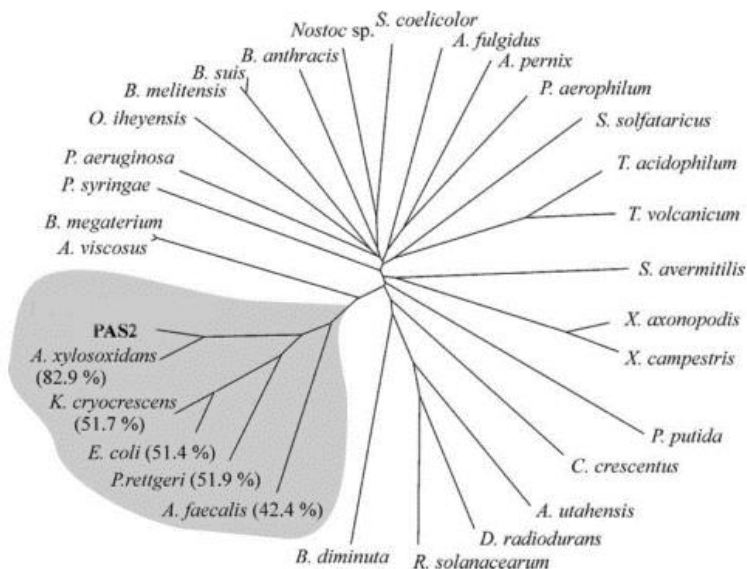


Рисунок 15. Филогенетическое дерево ПА, найденных при помощи BLAST. Серое поле содержит ПА, последовательности которых идентичны не менее чем на 40%.

Посредством функционального скрининга библиотеки генов почвенной культуры авторами работы [65] была обнаружена пенициллинацилаза **PAS2** на 51% идентичная есПА. По сравнению с есПА для PAS2 характерно 5-кратное улучшение связывания ФУК (табл.1), что является негативным фактором при использовании фермента в промышленно значимой реакции пГ. В реакции гидролиза NIPAB PAS2 характеризуется 4-кратным уменьшением константы Михаэлиса и 5-кратным улучшением константы специфичности по сравнению с есПА. В реакции гидролиза ампициллина PAS2 показывает 5-кратное улучшение константы Михаэлиса.

Таблица 1. Кинетические параметры гидролиза различных субстратов, катализируемых PAS2 и есПА [65].

Субстрат	PAS2			есПА		
	k_{cat} , с ⁻¹	K_M , мМ	k_{cat}/K_M	k_{cat} , с ⁻¹	K_M , мМ	k_{cat}/K_M
НРАВ	24	0,004	6000	18	0,015	1200
НРГВ	12	0,646	18,6	14	1,3	10,8
ФАА	23	0,03	767	46	0,156	295
п-ОН-ФАА	29	0,027	1074	47	0,114	412
ФГ амид	25	12	2,1	57	30	1,9
п-ОН-ФГ амид	16	9,1	1,8	25	12,2	2,3
Пен-Г	25	0,012	2083	39	0,013	3000
Ампициллин	16	0,575	27,8	25	2,5	10
Амоксициллин	15	0,399	37,6	17	1,07	15,9
Цефалексин	20	1,3	15,4	29	1,5	19,3
Цефадроксил	13	0,284	45,8	32	0,642	49,8

В отношении реакций синтеза пенициллинов PAS2 характеризуется значительным увеличением параметра β (табл.2). Однако параллельно происходит увеличение параметра α , что негативно сказывается на выходе целевого антибиотика. Исключение составляет реакция синтеза Пен-Г (0a), для которой наблюдается одновременное улучшение всех кинетических параметров, что приводит к более чем 2-кратному увеличению выхода целевого продукта.

Таблица 2. Комплексные кинетические параметры в реакции синтеза различных антибиотиков, катализируемых PAS2 и есПА (рН 7, 30°C).

Реакция	α		β , М ⁻¹		$1/\gamma$		P_{max} , мМ	
	PAS2	есПА	PAS2	есПА	PAS2	есПА	PAS2	есПА
0a	2,7	10,2	373	30	31	н.д.	1,8	0,8
1a	13,2	5,3	448	76	6	5	2,4	2
2a	20,9	6,9	560	86	19	5	2,7	1,7
3a	7,3	10,2	509	638	59	36	4,1	3,7
4a	25,4	21,7	444	427	н.д.	н.д.	2,4	2,2

Также следует отметить 3-кратное увеличение параметра $1/\gamma$ (максимально достижимый S/H) в реакции синтеза амоксициллина, что хорошо иллюстрирует график зависимости S/H от концентрации нуклеофила на рисунке 16.

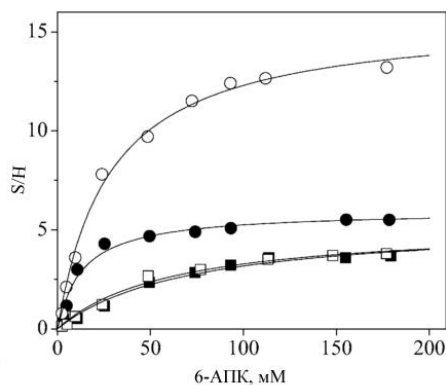


Рисунок 16. Синтез ампициллина при помощи PAS2(●) и esPA(■) и амоксициллина при помощи PAS2(○) и esPA(□).

Возможности белковой инженерии представляют большой интерес для дальнейшей оптимизации PAS2, что и было сделано теми же авторами в работе [69] (см. описание в разделе 1.2.2)

В работе [70] описана **asПА** (52% идентичности esПА), для которой каталитическая активность в реакции пG в 1,5 раза выше, чем для esПА. Данный фермент способен также катализировать гидролиз пенициллинов, содержащих α -аминогруппу в ацильной части, в 2 раза лучше, чем Пен-Г (табл.3) и, похоже, это единственная из описанных ПА, которая способна гидролизовать ампициллин быстрее, чем Пен-Г. В данном отношении особый интерес представляет гидролаза эфиров α -аминоксилот (АЭГ, [71]), однако, ее рассмотрение выходит за рамки данного обзора.

Таблица 3. Субстратная специфичность ПА и АЭГ из различных организмов.

Ферм.	Относительная активность, %					
	Пен-Г	Пен-V	Ампициллин	Амоксициллин	Цефалексин	NIPAB
asПА	100	23	197	199	190	65
esПА	100	10	51	38	61	32
afПА	100	12	83	н.д.	н.д.	н.д.

bmПА	100	0	35	н.д.	н.д.	н.д.
prПА	100	13	25	н.д.	н.д.	н.д.
АЭГ	н.д.	н.д.	100	6	214	н.д.

sПА (12% идентичности есПА) с повышенной специфичностью к ФОУК (Пен-V) и еще более к длинным алифатическим остаткам (Пен-K) описана в работе [72] (табл.4). При этом sПА практически неспецифична к ФУК (Пен-G), в связи с чем данный фермент принято относить к классу пенициллин-V-ацилаз.

Таблица 4. Каталитические характеристики sПА.

Субстрат	ацильная часть	k_{cat}, c^{-1}	K_M, mM	$k_{cat}/K_M, mM^{-1} c^{-1}$
Пен-V	ФОУК	60,25	2,05	39
Пен-F	3-гексеноил	7,69	1,2	6,4
Пен-K	октаноил	22,71	0,14	165
Пен-G	ФУК	3,4	60,2	0,08

kcПА (85% идентичности есПА) [73] характеризуется сдвинутым, по сравнению с есПА, в область более высоких значений температур профилем активности и расширенным в обе стороны профилем рН-стабильности (рис.17)

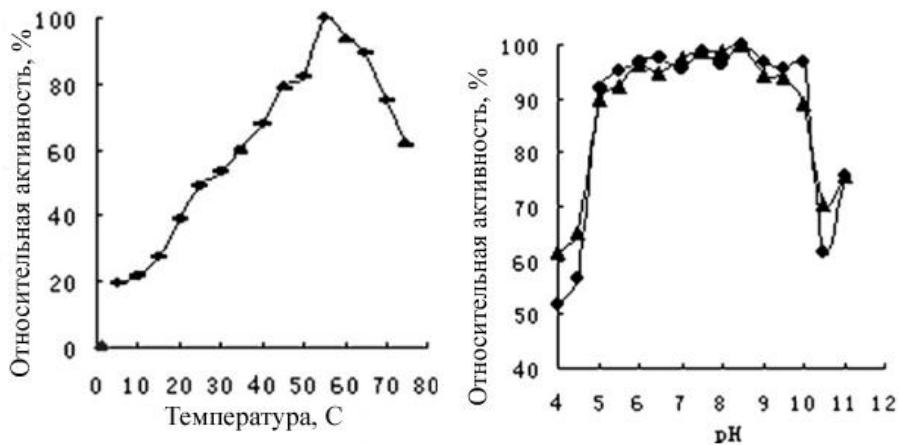


Рисунок 17. Температурный (слева) и рН (справа) профили активности kcПА.

bmПА (29% идентичности есПА) описана в работе [74] и также характеризуется сдвинутым в щелочную область рН профилем активности (рис.18).

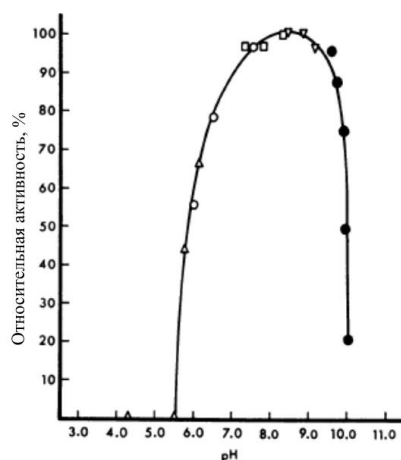


Рисунок 18. pH профиль активности для bmPA.

Для **krPA** известно, что параметр β в реакции 2а на 20% больше, чем в случае ecPA, однако параметр α увеличен на 63%, что, в конечном итоге, негативно сказывается на выходе целевого продукта [75]. Также в работе [76] было показано, что среди четырех ПА (krPA, ecPA, prPA и afPA), krPA обладает наилучшим показателем S/H в реакции 3а (рис.19).

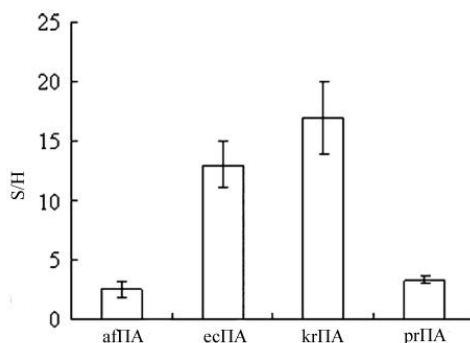


Рисунок 19. S/H в реакции 3а для ПА из 4-х различных источников.

Термостабильная **afPA** (39% идентичности ecPA) представлена голландскими учеными в работе [77]. Активность afPA не изменяется при инкубировании при 50°C в течение 20 мин, в то время как ecPA при тех же условиях необратимо теряет половину исходной активности. Улучшение термостабильности afPA авторы приписывают наличию в структуре дисульфидного мостика от двух цистеинов, которых нет у ecPA (см.3.2.4.6). В отношении реакции гидролиза NIPAB afPA обладает в 6 раз более высокой константой специфичности (k_{cat}/K_M), а в отношении реакции пG в 3 раза более высокой, чем ecPA (табл.5)

Таблица 5. Кинетические параметры гидролиза NIPAB и Пен-Г.

Фермент	NIPAB		Пен-Г	
	k_{cat}, c^{-1}	$K_M, мкМ$	k_{cat}, c^{-1}	$K_M, мкМ$
есПА	25(15)	15(30)	48(50)	4,6(3,8)
afПА	50(95)	5,1(4,5)	63(54)	2(4,2)

Эти данные несколько расходятся с данными работы [78] (табл.5 в скобках), которые свидетельствуют в сторону еще большего (42 раза) увеличения константы специфичности в реакции гидролиза NIPAB. Таким образом, авторы заявляют, что afПА является самой активной в реакциях гидролиза NIPAB и Пен-Г среди описанных на текущий момент (1996 г.) пенициллинацилаз. Также следует особо отметить сильно сдвинутый в щелочную область рН профиль активности (рис.20), что выгодно отличает afПА от многих других известных ПА, расширяет область ее применения и возможности для выделения и очистки.

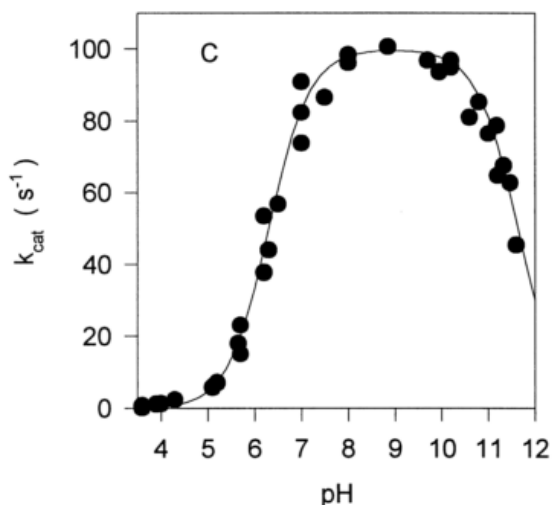


Рисунок 20. Профиль каталитической активности afПА.

В работе [79] китайскими учеными представлена **axПА** (51% идентичности есПА). По мнению авторов, это самая термостабильная ПА из всех ранее описанных в литературе на момент публикации. $t_{1/2}$ при $55^{\circ}C$ (рис.21) в 4 раза больше, чем для afПА, а оптимум активности приходится на температуру выше $60^{\circ}C$ (рис.22 слева). рН оптимум смещен в сторону более высоких значений и составляет рН 8,5 (рис. 22 справа).

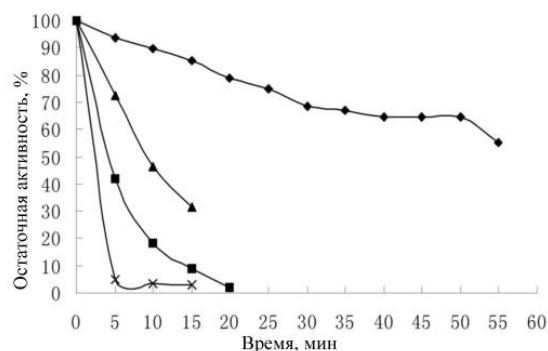


Рисунок 21. Термоинактивация ахПА и есПА. ♦ - ахПА при 55°C, ▲ - ахПА при 60°C, ■ - есПА при 55°C, х - есПА при 60°C.

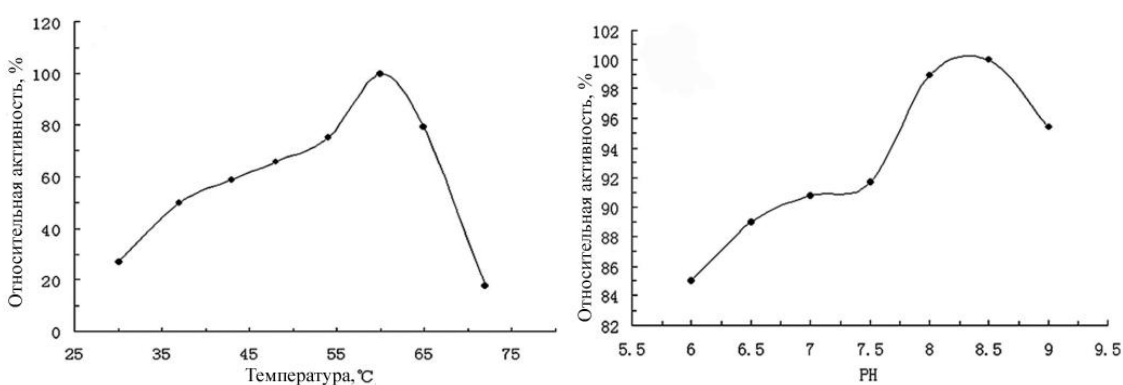


Рисунок 22. Температурный (слева) и рН (справа) профили активности ахПА.

По результатам гомологичного структурного моделирования и выравнивания первичных последовательностей было показано, что ахПА обладает повышенным числом внутренних ион-парных сеток, пониженным содержанием N и Q, большим количеством R, а также значительным числом P, что вносит существенный вклад в стабильность фермента (табл.6). Интересно также, что GC состав (69%) нуклеотидной последовательности максимальный из всех описанных ранее для ПА.

Таблица 6. Предполагаемые факторы, ответственные за повышенную стабильность ахПА.

Фермент	Солев. мостики	% N+Q	% S+T	% A	% R	R/K	% P
ахПА	506	8,96	9,08	13,68	7,21	13,68	6,84
есПА	478	11,93	12,71	8,76	4,23	8,76	5,15
ргПА	392	14,02	12,82	6,68	2,67	6,68	5,47

ахПА обладает также несколько улучшенными кинетическими характеристиками. В реакции гидролиза NIPAB наблюдается 2-3-кратное улучшение константы специфичности по сравнению с есПА.

Недавно испанские ученые открыли термостабильную **ttПА** (21% идентичности есПА) из термофильного источника, для которой оптимум экспрессии и активности одновременно приходится на 75°C ($t_{1/2}$ составляет 9 часов), что на 15°C больше, чем для ахПА. Фермент также характеризуется повышенной операционной стабильностью по отношению к органическим растворителям, детергентам и экстремальным рН. При этом рН оптимум активности приходится на рН 4. Для фермента характерна субстратная специфичность по отношению к алифатическому пенициллину-К, однако величина k_{cat}/K_M довольно низкая (0,016 мкМ/с), а по отношению к Пен-С константа специфичности падает на 5 порядков [80].

Подводя итог, стоит отметить, что под некоторые практические задачи можно подобрать пригодный природный вариант ПА. Однако, к сожалению, возможности белковой инженерии новых объектов весьма ограничены. Практически ни для одного из природных ПА не описана РСА структура (исключения - есПА и аfПА), большинство ферментов не охарактеризовано в биотехнологически важных реакциях, а также отсутствуют данные по мутационному анализу. Все это значительно сокращает возможности для изучения структурно-функциональных особенностей и рационального изменения свойств. Также следует отметить, что для каждого нового объекта необходимо оптимизировать методы экспрессии, выделения и очистки. Таким образом, наиболее изученная есПА является во многих отношениях более привлекательной. При этом стоит отметить, что закономерности, найденные для есПА, можно переносить и на другие объекты, как это сделано, например, в работах [69; 81; 82].

1.2.2 Белковая инженерия ПА

1.2.2.1 Случайный мутагенез

«Направленная эволюция»

Первые шаги в целенаправленном улучшении каталитических свойств ПА с помощью случайного мутагенеза были реализованы методом «направленной эволюции», основанной на селекции жизнеспособных штаммов при использовании ауксотрофов. В 1989 г. американские ученые использовали лейциновый ауксотроф для улучшения сродства есПА к фенилацильной части, содержащей α -аминогруппу [83]. Эксперимент проводили при пониженных значениях рН, в условиях почти полного протонирования α -аминогруппы субстрата. Исходным субстратом и единственным источником лейцина при этом служил D-ФГ-лейцин. В результате эксперимента был получен мутант, для которого при рН 6,5 k_{cat}/K_M увеличена в 10 раз, при том что k_{cat} увеличилась в 40 раз. Интересно, что улучшение тем более характерно, чем ниже рН. Таким образом, авторы показали возможность изменять специфичность есПА и получать мутанты, которые при низких рН гидролизуют амиды с α -аминофенилацетильным мотивом более быстро. В работе [84] для ксПА аналогичным образом были улучшены кинетические параметры для $S\alpha$ -замещенных производных ФУК, в том числе ФГ, МК, $S\alpha$ - CH_3 -ФУК, адипил, аминокадипил, фталил боковых радикалов. Также наблюдали увеличение активности в гидролизе ряда антибиотиков, в том числе в реакции пГ. Авторы обнаружили, что за приобретенные свойства отвечает мутация F360V, которая соответствует остатку **bF71** в есПА (см. приложение 1.1). В работе [85] при использовании пролиновых и лейциновых ауксотрофов удалось достичь улучшения в гидролизе ряда антибиотиков, в том числе на 30% ускорить реакцию пГ для мутанта G359D, что соответствует **bG70** в есПА. При этом эффект, предположительно, достигается не за счет улучшения специфической активности (она, как показано в той же работе, уменьшается в 3 раза), а за счет значительного ухудшения ингибирования продуктом гидролиза ФУК. Для другого мутанта («B10») удалось улучшить термостабильность при 45°C почти в 4 раза по сравнению с есПА. Однако уже при 50°C эффект исчезает.

ДНК-шаффлинг

Метод, который стал популярен в последние годы и который успешно используется для оптимизации ферментов, вовлеченных в технологические процессы, является ДНК-

шаффлинг. Эта методика включает в себя стадию рекомбинации гомологичных молекул ДНК из различных организмов, в результате чего получается набор белков с самыми разнообразными мутациями. Одним из вариантов этого метода является конструирование гибридных геномов в одном семействе, когда рекомбинируются гены гомологов с высоким уровнем идентичности ДНК.

В работе [86] объединяли гены есПА, ксПА (85% идентичности по ДНК есПА) и ргПА (52% идентичности по ДНК есПА), при этом наблюдали незначительное улучшение S/N лишь относительно ргПА. В более поздней работе [75], с той же целью, брали есПА, кгПА (77% идентичности по ДНК есПА) и ргПА (52% идентичности по ДНК есПА). Из 700 клонов 81 трансформант синтезировал ампициллин не более чем в 2 раза хуже, чем есПА, 19 трансформантов обнаруживали улучшение параметра S/N. Среди полученных гибридов 3 обнаружили заметные улучшения параметров в реакциях 1, 2а, 3 (табл.7) по сравнению с кгПА. Также наблюдали увеличение скоростей превращения.

Таблица 7. Синтетические свойства родительских и гибридных ПА в реакции 1а.

Фермент	α	β, M^{-1}	γ	P_{max}, mM	$v_{Ps} \%$
есПА	7,8	78	0,14	2,2	100
кгПА	12,7	98	0,19	2,1	110
ргПА	5,8	32	0,30	1,9	59
6G8	11,1	130	0,12	2,6	149
73C4	11,6	120	0,12	2,4	95
6B11	6,4	115	0,13	2,5	115

Интересно отметить, что для гибрида 6B11 избирательно улучшаются все параметры, при этом уменьшение α , что было показано в независимом эксперименте, вызвано 2-кратным увеличением K_p для продукта синтеза – ампицилина, а для гибрида 73C4 увеличение α вызвано 2-кратным увеличением K_s для D-ФГА. Секвенирование показало, что эти гибридные мутанты берут начало от есПА и содержат часть гена от кгПА. Также были

найлены случайные мутации, не относящиеся ни к одному из родительских генов, большинство из которых находилось далеко от активного центра. Для изучения вклада от мутации **bG375S**, найденной в гибриде 6G8, авторы сделали соответствующую одиночную замену в есПА. Было показано увеличение максимального выхода продукта на 22%, а соотношения S/N на 80% при сохранении уровня активности, по сравнению с есПА. При этом не наблюдали увеличения параметра α . Весьма интригующим является тот факт, что остаток bG375 находится на значительном расстоянии от активного центра (17A до каталитического bS1 и 10A до ближайшей карбоксильной группы бета-лактамного кольца субстрата). Еще одна мутация **aD148G**, обнаруженная в двух гибридах и также расположенная вдалеке от активного центра, для вновь созданного одиночного мутанта дает увеличение выхода в синтезе ампициллина на 20% при увеличении S/N на 80%. В данном случае остаток формирует множественные водородные связи с консервативными атомами, которые, по мнению авторов, при снятии заряда перестают удерживать каталитическую петлю, содержащую остатки aR145 и aF146, что приводит к ее более полному вовлечению в связывание по механизму индуцированного соответствия. В результате, aD148, также как и bG375, становятся потенциальными мишенями для направленного мутагенеза. Стоит подчеркнуть, что эти мишени практически нельзя идентифицировать на основании одних лишь рациональных подходов. Однако, к сожалению, авторы не дают никаких других характеристик мутантов. Так, например, не понятно, что при этом происходит со стабильностью фермента. Также, на наш взгляд, весьма опрометчиво со стороны авторов приводить математически рассчитанные на основании трех экспериментальных параметров комплексные значения P_{\max} и не учитывать существенную погрешность подобной оценки.

Циклическая пермутация

Получение одноцепочечной ПА, путем объединения а и b субъединиц при помощи короткого пептида позволяет получить фермент, созревание которого больше не зависит от автопротеолитических стадий процессинга. С целью получить два антипараллельных β -тяжа на двух близкорасположенных (5A) концах субъединиц есПА, Osuna J. с соавторами удалили первые 4 аминокислоты с N-конца а-цепи и последние 2 аминокислоты b-цепи [87]. Для соединения двух концов в общую антипараллельную β -структуру посредством включения потенциального β -поворота был предложен случайный тетрапептидный линкер. Для подбора оптимального состава линкера была генерирована библиотека мутантов объемом примерно

10⁶ вариантов, 40% которых отсеялись сразу на этапе роста. На этапе проверки специфической активности было отобрано 15 линкеров. Оказалось, что все пермутированные варианты обладают пониженной активностью в реакции пG (табл.8). Варианты с линкерами NEGM и DPAG были оттитрованы при помощи PMSF. Однако, никакой детальной характеристики препаратов авторы, к сожалению, не приводят.

Таблица 8. Последовательности линкеров функциональных одноцепочечных есПА.

Линкер	ДТ	NEGM	PGLR	GGEA	DPAG	GGLK	EPQR	GGG	RGAG	PGVG	GDAL	QGAG	GGSG	RAAV	AESS	GARD
Активность %	100	22	15	14	35	8	5	18	27	18	16	13	7	3	29	39

1.2.2.2 Направленный мутагенез

Анализ выравниваний

Еще до того, как была расшифрована структура ПА, производились попытки по направленному мутагенезу отдельных остатков. В работе [88] на основании выравнивания первичных последовательностей есПА с другими пенициллин-связывающими белками авторы получили информацию о некоторых консервативных регионах, в том числе было сделано предположение об участии одного из них (M168-K191, нумерация предшественника) в связывании Пен-Г. В работе [89] авторы установили, что замена остатка M168, соответствующего **aM142** в есПА, может влиять на специфичность ПА, а в работе [90] было зафиксировано примерно 2-кратное улучшение термостабильности для **M168A** по сравнению с ксПА ДТ. Данный остаток авторы работы [81] заменяли на А и V в ксПА и получили точечные мутанты с заметно ухудшенной специфичностью к Пен-Г и Пен-V по сравнению с ксПА ДТ. Также для данных мутантов авторы наблюдали нелинейный характер зависимости остаточной активности от концентрации ФМСФ, что, однако, может быть связано с чистотой проводимого эксперимента. Аналогично, на основании выравнивания, приведенного в работе [88], те же авторы предложили мутанты ксПА K375N и H481Y, соответствующие bK86 и bN182 в есПА, для которых в случае фенилацетил-4-аминобензойной кислоты было зафиксировано изменение в K_M при отсутствии изменения в k_{cat} . Это дало основание авторам предположить участие данных остатков в связывании амидной части субстрата. Однако,

после появления РСА структуры есПА стало понятно, что эти остатки находятся слишком далеко от активного центра и вряд ли могут принимать участие в узнавании субстрата.

Анализ РСА

После того как был проведен первый рентгеноструктурный анализ есПА [9], стало возможным определение роли тех или иных остатков в активном центре, что сформировало предпосылки для рационального подхода к дизайну фермента. В наиболее значимых работах [58; 91–93] основные усилия были направлены на изменение участков связывания ацильного донора и β -лактамного нуклеофила. Различные мутации по остаткам **aR145**, **aF146**, **bF24** привели к заметному улучшению параметров S/N , α , β , γ и, как следствие, выхода в реакциях 1-6. Однако, во многих случаях наблюдали существенную потерю активности и стабильности. Конкретные примеры мутаций рассмотрены ниже.

С целью получить структурную информацию об участке связывания амидной части субстрата, авторы работы [58] провели РСА неактивного мутанта bN241A в комплексе с Пен-Г (1fxv). Было установлено, что бета-лактам связывающий сайт формируется боковыми частями остатков aF146 и bF71, которые имеют Ван-дер-Ваальсовы контакты с тиазалидиновым кольцом Пен-Г, а также остатком aR145, взаимодействующим с карбоксильной группой субстрата посредством двух мостиковых молекул воды (чего, однако, не наблюдается, например, в структуре 1gm9). Роль остатка **aF146** затем изучили при помощи направленного мутагенеза. Было показано, что удаление ароматического остатка в мутантах aF146L и aF146A приводит к значительному ухудшению реакционной способности фенилацетилированных субстратов (табл.9), однако, в тоже время наблюдается заметное улучшение S/N в реакции синтеза Пен-Г при заметном ухудшении связывания 6-АПК.

Таблица 9. Кинетические характеристики есПА ДТ и мутантов по остатку aF146.

Фермент	ФАА	НРАВ	6-АПК
	k_{cat}/K_M ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	k_{cat}/K_M ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	K_i (мМ)
	0,31	1,43	32
aF146Y	0,5	0,38	28
aF146A	$5,8 \cdot 10^{-3}$	$3,0 \cdot 10^{-3}$	180
aF146L	$1,7 \cdot 10^{-3}$	$1,5 \cdot 10^{-3}$	116

Замена же на родственный Y приводит к ухудшению синтетических способностей фермента при неизменности константы связывания (ингибирования) 6-АПК. Данный пример иллюстрирует, что не только связывание 6-АПК может играть ключевую роль в различии синтетических способностей фермента. При изучении роли соседнего остатка **aR145** теми же авторами в работе [59] было обнаружено, что замены его на С, К и L приводят к 3-6-кратному увеличению параметра S/N в реакции синтеза ампициллина. Однако, активность в реакции пG падает более чем на порядок.

В работе [92] авторы решили изучить роль гидрофобных остатков в реакциях гидролиза и синтеза бета-лактамных антибиотиков. С этой целью был проведен мутационный анализ 3-х фенилаланинов - **aF146**, **bF24** и **bF57**- в активном центре есПА (рис 23). По данным

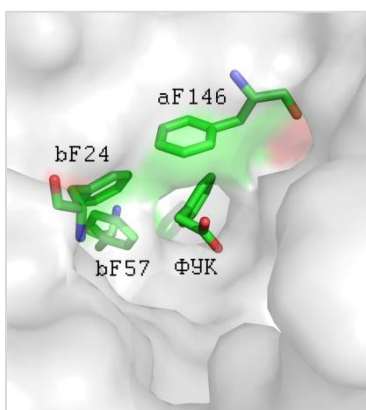


Рисунок 23.

Гидрофобный карман есПА в структуре 1pnl.

РСА (1pnl) остаток bF24 находится в стэкинге с фенильным кольцом субстрата, остаток aF146 локализован на входе в гидрофобный карман, а остаток bF57 находится на дне кармана и может быть важен в поддержании структуры связывающего сайта. Данные остатки заменяли на Y,W,A и L, что могло повлиять на форму и размер ацил-связывающего кармана при сохранении его гидрофобности. Во всех случаях наблюдали уменьшение константы специфичности в реакции гидролиза NIPAB, что говорит о важной роли данных остатков в правильном связывании субстрата. В реакции 1a, аналогично реакции гидролиза NIPAB, во всех случаях наблюдали падение активности, за исключением мутанта bF146Y. Следует отметить, что это единственный мутант, для которого было характерно улучшение K_M (3 раза) в реакции гидролиза NIPAB, а также уменьшение константы ингибирования ФУК. Однако в реакции 1a данный мутант оказался наихудшим в отношении S/N (40 раз). Мутации по остатку bF57 не привели к существенным изменениям в S/N в реакции 1a, а наибольший эффект наблюдали для мутаций bF24A (2 раза) и aF146L(3 раза). Однако, скорость ацилирования для обоих мутантов была в 10 и 20 раз ниже, соответственно. Поскольку скорость ацильного переноса с эфиров обычно выше, чем с амидов, оба мутанта протестировали в реакции 1э, при этом для мутанта bF24A наблюдали сравнимую с ДТ активность и почти 3-кратное увеличение выхода ампициллина. Мутант же aF146L оказался в 20 раз менее активным. Таким образом, мутант bF24A потерял амидазную активность, но сохранил эстеразную, а мутант aF146L потерял и ту и другую

активности. В связи с этим, оставшуюся часть работы авторы посвятили изучению свойств мутации bF24A. При изучении стационарной кинетики с широким спектром ацильных доноров выяснилось, что мутация bF24A, помимо увеличения отношения эстеразной/амидазной активности, приводит к улучшению связывания C α -замещенных синтетических ацильных доноров по сравнению с ФУК, а также к уменьшению ингибирования самой ФУК. Для изучения синтетических способностей мутанта были определены параметры альфа и S/H для реакций 1a-4a и 1э-4э (табл.10).

Таблица 10. Кинетические параметры синтеза полусинтетических бета-лактамных антибиотиков для есПА ДТ и bF24A.

Реакция	S/H		α	
	ДТ	bF24A	ДТ	bF24A
1a	1,4	2,9	16,0	37,5
1э	1,4	3,1	2,9	0,9
2a	1,7	3,1	22,2	14,6
2э	1,8	3,0	15,4	0,4
3a	4,9	15,8	63,3	43,5
3э	5,2	18,4	11,4	1,1
4a	4,6	15,0	55,6	70,8
4э	5,2	21,0	38,5	2,0

Исходя из представленных данных, можно сделать вывод, что в реакциях 1э-4э для мутанта bF24A характерно одновременное улучшение обоих параметров. При изучении зависимости S/H от концентрации нуклеофила в реакции 1a также было показано улучшение параметра γ , что делает данный мутант выгодным в более широком диапазоне начальных концентраций. Также авторами была изучена интегральная кинетика реакций 1a, 1э, 3a и 3э, которая подтвердила существенное превосходство мутанта bF24A в отношении выхода для реакций с эфирами (рис.24). Однако, к сожалению, эфиры в технологическом отношении не столь удобны, как амиды, что в первую очередь связано с их повышенной лабильностью.

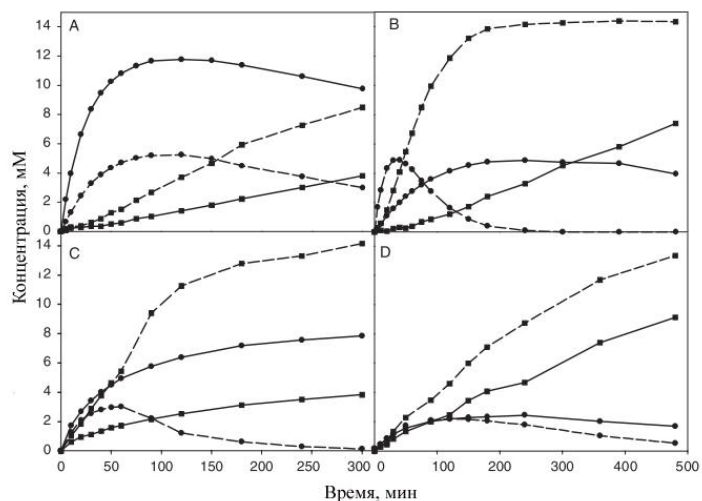


Рисунок 24. Кинетически контролируемый синтез ампициллина и цефалексина при использовании есПА ДТ (пунктир) и bF24A (сплошная). А–реакция 3э, В–реакция 3а, С–реакция 1э, D–реакция 1а. (● - антибиотик, ■ - ФГ).

Для эффективного синтеза полусинтетических бета-лактамных антибиотиков (ампициллин, амоксициллин, цефадроксил и др.) благоприятна низкая специфичность к ФУК и высокая к α -замещенным производным ФУК. В работе [93] голландские ученые получили 3 мутанта – **aF146Y**, **bF24A** и **aF146Y+bF24A**, удовлетворяющие данным требованиям. Удаление ароматического кольца в мутанте bF24A приводит к структурным перестройкам в активном центре, в результате чего ФУК связывается в существенно менее активной открытой конформации, в то время как в ДТ ФУК связывается в закрытой конформации. При этом исчезают водородные связи между карбонильным кислородом ФУК и остатками β A69 и β N241, образующими оксианионный центр, что объясняет 20-кратное ухудшение связывания (табл.11). В отличие от ФУК, α -X-ФУК (X=CH₃, OH, NH₂) связывается в закрытой конформации, при этом α -X занимает место удаленной фенильной группы, что приводит к существенному улучшению связывания.

Таблица 11. Константы ингибирования есПА и ее мутантов С α -замещенными производными ФУК.

Субстрат	есПА		bF24A		aF146Y		bF24A+ aF146Y	
	K _i (мМ)	K _{iR} /K _{iS}	K _i (мМ)	K _{iR} /K _{iS}	K _i (мМ)	K _{iR} /K _{iS}	K _i (мМ)	K _{iR} /K _{iS}
ФУК	0,06		1,1		0,03		1	
(R)- α -CH ₃ -ФУК	0,47	0,42	0,12	0,083	0,2	0,25	0,076	0,21
(S)- α -CH ₃ -ФУК	1,1		1,5		0,5		0,36	
(R)-МК	31	3,1	3,5	0,61	13	2,9	6,2	0,76
(S)-МК	10		5,7		4,1		8,2	
(R)-ФГА	40		25		4		15	

Интересно также заметить, что мутация по остатку β F24 оказывает сильное влияние на стереоспецифичность фермента по отношению к (R)-изомерам С α -замещенных ФУК и может рассматриваться как потенциальная мишень для изменения энантиоизбирательности фермента с целью получения оптически чистых С α -замещенных производных ФУК (идея реализована в работе [94], см. далее). Замена α F146Y не сопровождается конформационными перестройками в активном центре. При этом наблюдается аналогичное есПА ДТ связывание ФУК. Однако, при связывании С α -замещенных ФУК образующиеся Ван-дер-Ваальсовы контакты между С α -заместителем и α Y146:ОН делают связывание более продуктивным. Как уже было отмечено выше, данные мутации имеют ряд недостатков. Так для мутации bF24A характерно значительное падение амидазной активности [92], а для мутации bF146Y наблюдается существенное ухудшение эффективности синтеза [58].

В работах [95; 96] авторы получили и детально изучили мутанты **bF71L** и **bF71C**, обнаруженные ранее методом «направленной эволюции» в работе [83]. Данные мутации приводят к более чем 100-кратному улучшению константы специфичности в реакции гидролиза глутарил-лейцина при pH 6,0 по сравнению с есПА ДТ. При изучении кинетики реакции гидролиза NIPAB также были отмечены значительные улучшения константы специфичности, в основном за счет улучшения связывания (табл.12).

Таблица 12. Кинтетические параметры гидролиза NIPAB для есПА ДТ и мутантов по остатку bF71.

Фермент	k_{cat} (с ⁻¹)	K_M (мкМ)	k_{cat}/K_M (с ⁻¹ мкМ ⁻¹)
ДТ	20	18	1,1
bF71C	19	3,1	6,1
bF71L	37	3,4	11

При изучении денатурации в 4,5 М растворе мочевины наблюдали существенное улучшение стабильности для мутанта bF71C. При pH 8,0 и температуре 54°C фиксировали 2-кратное увеличение времени полуинактивации ($t_{1/2}$) для обоих мутантов. Данные мутанты оказались также более стабильными при повышенных pH. При изучении остаточной активности при pH 10,8 в присутствии NIPAB были получены следующие данные для констант инактивации первого порядка (k_i): есПА ДТ $2,3 \cdot 10^{-3}$, bF71C $3,8 \cdot 10^{-5}$, bF71L $1,3 \cdot 10^{-4}$ с⁻¹. Однако, методика изучения pH-стабильности не соответствует общепринятой, так как наличие субстрата, может сильно повлиять на интерпретацию результатов. Не понятно, что в данном случае является решающим: то ли сохранение стабильности, то ли просто повышенная каталитическая активность мутантов.

Шаповаловой И.В. [96; 97] было проведено исследование энантиоселективности ферментных препаратов есПА, содержащих мутации по остатку bF71 в реакциях гидролиза N-фенилацетильных производных фенилглицина и аспарагиновой кислоты (табл. 13).

Таблица 13. Стереоселективность (E) в реакции гидролиза N-фенилацетильных производных ФГ и аспарагиновой кислоты для есПА ДТ и мутантов по остатку bF71.

Фермент	E (ФГ)	E (Асп.)
ДТ	1960	120
bF71K	12000	18
bF71E	5800	63
bF71L	220	170

bF71Y	2380	10
bF71R	300	30
bF71W	1700	46
bF71H	2100	12

Было показано, что введение мутаций **bF71K** и **bF71E** способствует увеличению стереоселективности фермента в 3-6 раз в случае ФГ в амидной части субстрата. В случае аспарагиновой кислоты, когда хиральная дискриминация субстратов представляет более сложную задачу, некоторое увеличение стереоселективности наблюдали только для мутации bF71L.

Ямсковой О.В. было проведено детальное исследование кинетических параметров мутантных форм есПА, содержащих мутации по остаткам **aR145**, **aS149**, **bF71**, **bT384** и **bG385** в реакциях ацилирования аминокислот и гидролиза амидов и установлено, что мутации aR145L и bF71L приводят к значительному улучшению стереоселективности в реакциях ацилирования аминокислот (табл. 14) и гидролиза их N-фенилацетильных производных (табл. 15) [48]. Также наблюдалось существенное улучшение эффективности и скорости синтеза по сравнению с есПА ДТ. Однако, несмотря на довольно существенные улучшения стереоселективности, величина параметра все еще на порядок ниже, чем для аминокислот, и недостаточна для получения препарата в энантиомерно чистой форме.

Таблица 14. Кинетические параметры ферментативного стереоселективного ацилирования рацемата 2-АБ амидом R-МК (pH 9,5, 25°C).

Фермент	ОИ _{кат}	ОИ _{S/H}	E
ДТ	1	1	26
bF71L	22	8,5	95
aR145L	6,3	3,8	35

Таблица 15. Стереоселективность в реакции гидролиза N-(R)-манделил-производных аминокислот для есПА ДТ и мутантных форм bF71L и aR145L (рН 7,5, 25°C).

Субстрат	Е (ДТ)	Е (bF71L)	Е (aR145L)
N-(R)-Манделил-(±)-2-АБ	25	100	37
N-(R)-Манделил-(±)-ФА	4,2	39	7,4

Авторы работы [98] изучали аминокислотные остатки, расположенные на поверхности белковой глобулы, и продемонстрировали, что изменение поверхностного заряда может повлиять на стабильность фермента при определенных рН. С помощью вычислений электростатических потенциалов в программе DELPHI авторы предложили мутацию **bW431R**, локализованную на расстоянии 32Å от активного центра, которая привела к 2-кратному увеличению $t_{1/2}$ при рН 8,5. Данный эффект обусловлен, предположительно, взаимодействием аргинина и bQ318 на соседней альфа спирали. Хотя сам по себе низкий по величине эффект вряд ли имеет практическую ценность, однако, может найти свое место в многоточечных конструкциях.

В работе [99] китайскими учеными были получены мутанты bmПА, которые оказались более термостабильными, а также устойчивыми в присутствии органических растворителей. При этом авторы опирались на то положение, что фермент более стабилен при рН близком к рI. Для понижения рI были произведены замены поверхностных положительно заряженных неконсервативных остатков К на нейтральные маленькие А – **bK427A**, **bK430A**, **bK427A+bK430A**, что привело к гидрофобизации поверхности белка и, как следствие, стабилизации по отношению к органическим растворителям (диметилформамид). Для двойного мутанта также было зафиксировано 2-кратное увеличение $t_{1/2}$ при 55°C, что делает его сравнимым с afПА. К сожалению, в методической части авторы не приводят никаких пояснений к кинетическим экспериментам. Также по части термостабильности отсутствует иллюстративный материал, что вызывает некоторое недоверие к полученным результатам.

Юрьеву Р. с соавторами удалось получить мутант afПА, в котором а-цепь остается связанной с природным линкером за счет двух мутаций **T206G+S213G**, которые приводили к заметному замедлению процессинга [100]. Для данного мутанта характерно 2-кратное

увеличение k_{cat} и 3-кратное уменьшение K_M в реакции гидролиза пG по сравнению с afПА ДТ. Также данный мутант обладает повышенной операционной стабильностью при сохранении термо- и рН-стабильности.

В работе [101] корейские ученые изменили природную пенициллиновую специфичность есПА на цефалоспориновую, открывая тем самым возможность использования ПА в реакции цС. Для этого было проведено структурное выравнивание для есПА и pdЦА (23% идентичности есПА), с целью установления соответствия остатков, ответственных за связывание ароматической гидрофобной ацильной части пенициллина в есПА и линейной гидрофильной ацильной части цефалоспориона в pdЦА (табл.16).

Таблица 16. Соответствие остатков есПА и pdЦА.

	есПА	pdЦА
Остатки важные для катализа	bSer1	bSer1
	bGln23	bHis23
	bAla69	bVal70
	bAsn241	bAsn244
Остатки, формирующие участок связывания ацильной части	bVal56	bArg57
	aPhe146	aTyr149
	bThr32	bTyr33
	bIle177	bPhe177
	bPro49	bGln50
	bTrp154	bTyr153
	bPhe24	bLeu24

Далее, 7 остатков гидрофобного кармана есПА заменили на соответствующие 7 остатков из pdЦА. Полученный таким образом многоточечный мутант характеризовался 8-кратным улучшением специфичности по отношению к цефалоспоринону. Но, к сожалению, эти результаты представляют собой не более чем научную ценность, так как специфичная активность природного цефалоспоринового фермента осталась недостижима.

1.2.2.3 Комбинированные методы

Методика сайт-насыщающего мутагенеза была реализована в работе [91]. Совместными усилиями российских и голландских ученых удалось добиться значительного увеличения параметра β за счет мутаций по остатку aR145, который по данным PCA и, в соответствии с представлениями работы [102], может опосредованно взаимодействовать с карбоксильной группой Пен-Г. Предварительные исследования реакции ферментативного синтеза ампициллина в разбавленных растворах показали, что у всех 19-и мутантов возрастает способность к переносу ацильной группы на 6-АПК. Затем были отобраны 3 наиболее перспективных мутанта - **aR145L**, **aR145G**, **aR145S** и проведено детальное изучение кинетических параметров (рис.25, табл.17).

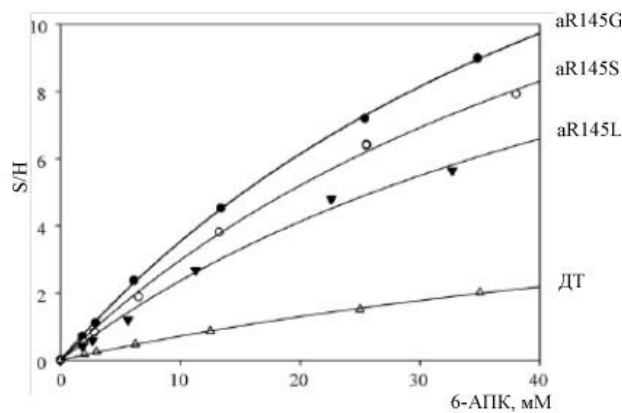


Рисунок 25. Нуклеофильная реакционная способность 6-АПК в реакции 1a для есПА и мутантов по остатку aR145.

Таблица 17. Эффективные кинетические параметры в реакции 1a для есПА ДТ и ее мутантов по остатку aR145.

Фермент	α	β , М ⁻¹	γ	P_{\max} , мМ
ДТ	7.7	80	0.14	2.2
aR145G	29	420	0.04	3.6
aR145S	14	350	0.05	3.3
aR145L	15	280	0.06	2.8

Полученные данные свидетельствуют о том, что удаление положительного заряда в позиции a145 приводит к значительному увеличению нуклеофильной способности 6-АПК. Почти синхронное увеличение параметра α может свидетельствовать о том, что улучшение связывания нуклеофила ($K_n \downarrow$), выраженное в увеличении параметра β , неизбежно ведет к улучшению связывания продукта синтеза ($K_p \downarrow$), и невозможно улучшить оба параметра одновременно, в той степени, в которой невозможно различить связывание нуклеофила и продукта (рассмотрение данного вопроса см.3.7). Однако негативное влияние α можно в какой-то степени снизить, если выводить ампициллин из сферы реакции или использовать различие в амидазной/эстеразной активности фермента в случае, если донором ацильной части является эфир.

Стереоселективность ПА в отношении фенилацетильных производных с $S\alpha$ -X группой не высока, поэтому в реакциях синтеза полусинтетических бета-лактамных антибиотиков используются энантимерно чистые ацильные доноры. В работе [94] авторы применили метод SSM для улучшения стереоселективности есПА в отношении D-ФГ, что делает возможным использовать более дешевый рацемат донора. Исходно, при использовании рацемата метилового эфира ФГ удается получить R-ампициллин с энантимерным избытком (э.и.) 37% при достижении максимального выхода. Для дизайна стереоселективности были отобраны 5 остатков на расстоянии $<6\text{\AA}$ от $S\alpha$ -атома сульфоксида Пен-G в структуре 1gm9: aF146, bP22, bF24, bT68 и bF71, каждый из которых подвергли насыщающему NNK мутагенезу. В результате из пяти библиотек были отобраны 23% активных варианта, среди которых 14% характеризовались улучшением стереоселективности в реакции синтеза (R)-ампициллина и 59% - в реакции синтеза (S)-ампициллина, что, по результатам

секвенирования, соответствует 4 и 8 неповторяющимся вариантам (табл.18, представлены лучшие варианты).

Таблица 18. Энантиомерный избыток и другие характеристики в реакции синтеза R- и S-ампициллина из 90мМ метилового эфира *rac*-ФГ и 20 мМ 6-АПК.

	Э.и.(R)	Э.и.(S)	Сумм.вых. %	ОИ _{кат}
ДТ	37%	-	30,7	1
bF24A*	98%	-	42,8	0,61
bF24S	97%	-	35,5	0,027
bF24P	95%	-	27,2	0,13
bF24G	70%	-	17,7	0,06
aF146A	-	51%	13,5	0,28
aF146Q	-	57%	13,2	0,05
aF146R	-	65%	10,4	0,03
aF146Y	-	36%	5,1	0,05

*Мутант bF24A не был обнаружен в результате скрининга библиотек, но был получен отдельно.

Исходя из представленных данных, можно сделать вывод, что мутации по остатку **bF24** приводят к улучшению стереоселективности по отношению к R-энантиомеру, что согласуется с результатами работы [93], а по остатку **aF146** к улучшению стереоселективности по отношению к S-энантиомеру. Данный вывод находится в соответствии с данными PCA (1k7d), где показано, что остаток bF24 находится с одной стороны C α -CH₃-группы, а aF146 с противоположной. Авторами также продемонстрированы заметные улучшения синтетических способностей мутантов на основании замен по остатку bF24 в реакции 1э (ОИ_{конв} до 86/38, ОИ_{S/H} до 4,2). Впервые в данной работе была обнаружена рацемазная активность ПА. Так, например, при проведении синтеза ампициллина, катализируемого мутантом bF24A, при использовании метилового эфира S-ФГ наблюдается накопление 8% R-ампициллина (рис.26).

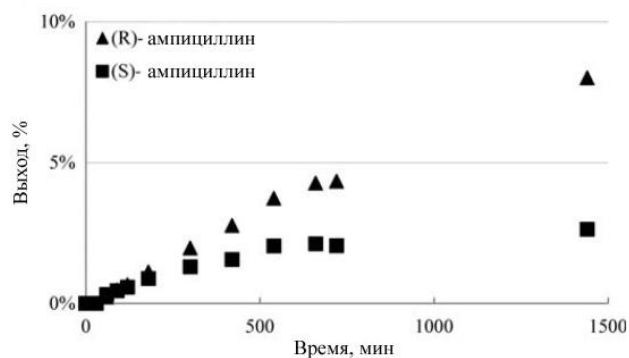


Рисунок 26. Синтез ампициллина из 20мМ 6-АПК и 60мМ метилового эфира S-ФГ, катализируемый мутантом bF24A.

Принимая во внимание ценность полученных результатов, следует, однако, отметить, что только для двух мутантов наблюдается сохранение достаточного уровня каталитической активности. При этом для наиболее перспективного R-активного bF24A не представляется возможным использовать традиционный ФГА в качестве ацильного донора, в связи с потерей ферментом амидазной активности.

CAST

С целью улучшения каталитических свойств пенициллинацилазы PAS2 в работе [69] проводили комбинированный сайт-насыщающий мутагенез сразу по трем остаткам **aR160**, **aF161**, **bF24**, соответствующим остаткам aR145, aF146, bF24 в активном центре есПА. Была получена и проскринирована на ВЭЖХ библиотека из 700 мутантов (рис.27).

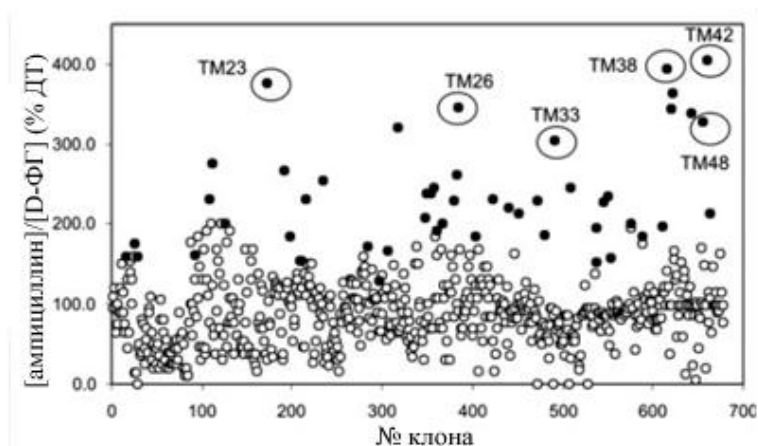


Рисунок 27. Скрининг мутантов PAS2. Клоны, обведенные овалом – наилучшие отобранные мутанты; клоны, закрашенные черным подвергали повторному скринингу (периплазматические экстракты).

При этом были отобраны комбинации мутаций, которые привели к улучшению параметров S/N, α , β , γ в реакциях 1а/э и 3а/э и значительному увеличению выхода в реакциях 1э и 3э (табл.19 и 20).

Таблица 19. Отобранные в ходе скрининга мутанты.

Название	Мутации
TM23	aR160 K +aF161 L +bF24 A
TM26	aR160 Q +aF161 L +bF24 Q
TM33	aR160 R +aF161 F +bF24 A
TM38	aR160 P +aF161 A +bF24 V
TM42	aR160 Q +aF161 R +bF24 I
TM48	aR160 P +aF161 A +bF24 Q

Таблица 20. Параметры в реакциях 1а/э и 3а/э для PAS2 ДТ и отобранных мутантов.

Фермент	Ац. донор	Реакция 1			Реакция 3		
		α	β_0, mM^{-1}	$1/\gamma$	α	β_0, mM^{-1}	$1/\gamma$
PAS2 ДТ	амид	13,2	0,5	6	7,3	0,5	59
	эфир	16,4	0,5	6	9,1	0,5	59
TM23	амид	218	6,3	364	58,8	18,4	69
	эфир	8,8	6,3	364	2,4	18,4	69
TM33	амид	209	10,2	286	88,8	21,5	154
	эфир	11,6	10,2	286	4,9	21,5	154
TM38	амид	200	4,9	167	57,2	21,1	58
	эфир	7,6	4,9	167	2,2	21,1	58

По скорости превращений в реакциях с амидами мутантные ПА все же уступают родительской PAS2, что, вероятно, связано с наличием мутации по остатку bF24. Также высокие значения параметра α в случае амидов не позволяют использовать традиционный D-ФГА в качестве ацильного донора. Стоит отметить, что при оценке эффективности синтеза авторы использовали упрощенный параметр β_0 , полученный на основании лишь начального участка зависимости S/N от концентрации нуклеофила, а параметр $1/\gamma$ определялся с

помощью математических построений при использовании шести экспериментальных параметров, что вряд ли заслуживает должного внимания.

Подобная стратегия была также реализована в работе [82] для bmПА (30% идентичности есПА), для которой с помощью комбинированного мутагенеза были получены одиночные и двойные мутанты по остаткам **aR144**, **aF145**, **bF24**, что привело к 3-кратному улучшению параметра S/N в реакции 3a по сравнению с родительской bmПА. Однако, показатели характерные для есПА остались недостижимы.

Консенсусный подход

В работе [103] авторы разработали новый подход для создания более термостабильной есПА. Для этого на первом этапе проводилось выравнивание первичных последовательностей а- и b-субъединиц восьми известных ПА класса Pa. Были найдены 109 из 766 возможных остатков в есПА, которые, с одной стороны, были отличны по аминокислотному составу от соответствующих остатков в есПА и, с другой стороны, встречались в более чем 50% остальных последовательностей (консенсусный подход). Для сужения полученной библиотеки выбирались замены, соответствующие следующим критериям: (i) чтобы снизить возможность влияния на активность, мутация должна находиться на расстоянии не менее чем 10Å от активного центра, (ii) если мутация находится в спирали, то она не должна вызывать дестабилизирующего эффекта, (iii) существующие водородные связи и солевые мостики остаются нетронутыми, (iv) исключаются из рассмотрения стабилизирующие мутации уже описанные в литературе. В результате было предложено 20 мутаций, что составляет всего лишь 3% остатков зрелого белка (табл. 21).

Таблица 21. Термостабильность мутантов предложенных в работе [103].

Мутация	Вторичная структура	Расстояние до а.ц. (Å)	Термостабильность
aW25Y	H	31,2	+
aA80R	H	29,9	+
aM90R	H	29,5	=
aQ118E	H	22,6	н.а.
aT121D	H	27,7	-
aE130T	U	27,9	н.а.
aT150N	U	15,5	+
bS9E	T	21,9	н.а.
bA84P	B	42,2	+
bV97K	B	37,2	н.а.
bL100E	B	32,6	+
bA149Q	H	20,1	н.а..
bV184K	T	22,7	-
bA305D	H	29,9	+
bT311P/Q312A	U/T	38,2/36,9	+
bN348D	H	18,3	+
bV359L	H	19,4	+
bS374T	U/T	15,6	=
bV400L	T	20,8	+
bA545K	H	32,1	-

H - альфа-спираль, B - бета тяж, T - поворот, U - бесструктурный элемент;

+ повышенная термостабильность, - пониженная, = эквивалентная.

Таким образом, среди полученных мутантов 10 обладали повышенной термостабильностью, 4 - пониженной, 2 - эквивалентной, а оставшиеся 7 характеризовались слишком низкой активностью. Улучшение времени полуинактивации ($t_{1/2}$) составило от 1.2 до 3 раз. Для сопоставления экспериментальных данных с возможными теоретическими предсказаниями были испытаны программы «I-Mutant», «Fold-X», «PROSA 2003» и «SCRATCH», однако, не было найдено сколько-нибудь удовлетворительного соответствия.

Столь высокий успех (50%) предложенных мутаций гораздо выше, чем возможный успех при использовании методик случайного мутагенеза, при этом данный подход не требует знаний о механизме инактивации ПА. Однако, возможно, именно детальное понимание механизма термоинактивации в будущем может привести к существенно более стабильным вариантам. Интересным продолжением исследования, на наш взгляд, было бы объединение полученных мутаций и определение аддитивных комбинаций.

1.2.2.4 Расширение возможностей белковой инженерии

При всем многообразии подходов к улучшению технологических показателей процесса следует отметить возможность их совместного использования. При этом можно ожидать не только аддитивности, но и синергизма эффектов. Так комбинацией взаимодополняющих подходов белковой инженерии и иммобилизации можно улучшить количественные показатели в реакциях синтеза бета-лактамовых антибиотиков. В работах [104; 105] за счет удлинения b-цепи есПА на 6 остатков в мутанте 3G3K и иммобилизации на глиоксильной подложке удалось в несколько раз улучшить S/N в реакциях ацилирования производных 7-АЦК. Эффект, предположительно, обусловлен увеличением трансферазной активности за счет улучшения доступности активного центра для нуклеофила, что дополнительно фиксируется при помощи иммобилизации. Данный пример иллюстрирует, что весьма удаленные от активного центра поверхностные остатки также могут влиять на каталитическую активность фермента. Однако, к сожалению, авторы в своей работе ограничиваются лишь эфирами, искусственно подавляя спонтанный гидролиз за счет уменьшения температуры до 4°C, что, на наш взгляд, вряд ли сможет найти применение в промышленной технологии.

В работе [106] авторы провели иммобилизацию мутантов **bF24A** и **bF24A+aF146Y** на глиоксильной подложке Eupergit C250L и добились высоких степеней превращения в реакциях 3э, 10э, 11э (табл. 22.).

Таблица 22. Скорость и максимальный выход ферментативного синтеза бета-лактамных антибиотиков, катализируемого иммобилизованными есПА ДТ и мутантами при различных температурах.

Фермент	Реакция	T(°C)	V _s (мкМ/мин)	Выход (%)
ДТ	3а	28	4,4	67
bF24A		28	0,1	68
bF24A+aF146Y		28	0,3	77
ДТ	3э	4	0,4	90
		28	3,7	76
bF24A		4	0,3	99
		28	1,9	98
bF24A+aF146Y		4	0,8	99
		28	4	99
ДТ	9э	4	0,4	84
		28	2	65
bF24A		4	0,1	98
		28	1,5	98
bF24A+aF146Y		4	0,5	99
		28	3,7	99
ДТ	10э	28	0,2	59
bF24A		28	0,5	98
bF24A+aF146Y		28	0,6	99

Как видно из таблицы, в случае традиционных амидов эффект значительно менее выражен и компенсируется многократным снижением активности.

При комбинации «направленной эволюции» с фаговым дисплеем [107], можно существенно расширить возможности первой, которую становится возможным проводить *in vitro* при использовании более широкого круга субстратов. Применяя технику фагового дисплея, в работе [108] впервые были получены малоактивные мутанты по остатку bN241 – **bN241S** и **bN241G**, для которых при более чем 40-кратном падении k_{cat} наблюдали 3-5-кратное улучшение K_M в реакции гидролиза NIPAB. Малоактивные мутанты, сохранившие

способность к связыванию, авторы планируют использовать в дальнейшем для скрининга новой специфичности.

В заключении хотелось бы отметить, что на сегодняшний момент в отношении ПА реализованы практически все ранее разработанные подходы белковой инженерии. Начиная с 80-х годов параллельно появлялись работы по случайному и направленному мутагенезу ПА (диагр. 1). Накопление информации о структурно-функциональных особенностях ПА и усовершенствование техники скрининга привело к появлению современных комбинированных методов, развитие которых, на наш взгляд, в дальнейшем будет во многом определять тенденции и успехи белковой инженерии ПА и других ферментов.

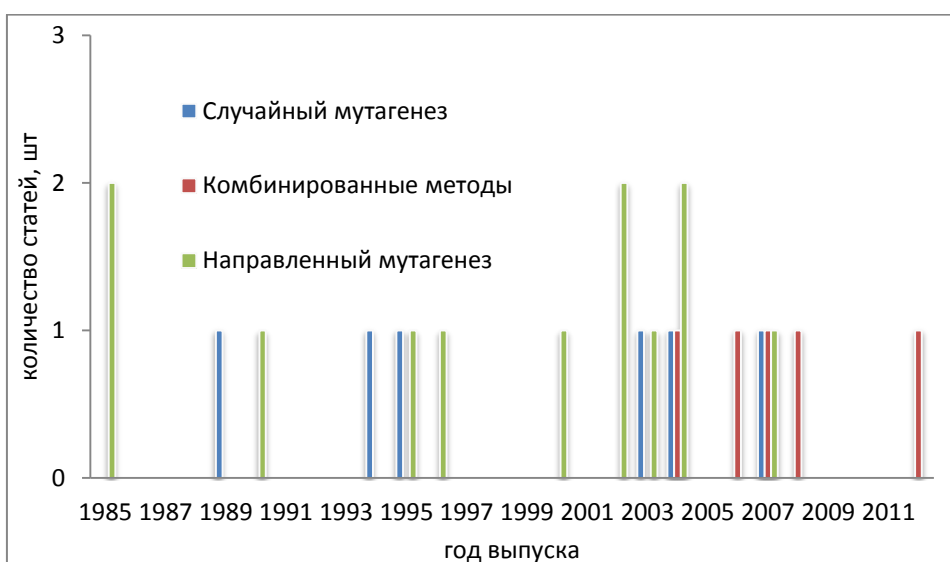


Диаграмма 1. Количество статей по белковой инженерии ПА.

1.2.3 Заключение

есПА весьма хорошо изучена и представляет большой интерес для биотехнологии. Скрининг природных ПА позволяет найти новые ферменты, однако их каталитические возможности ограничены. На текущий момент найдены природные ПА, которые существенно превосходят есПА по специфичности к $S\alpha$ -замещенным ФУК (asПА), каталитической активности в отношении гидролиза NIPAB (PAS2, afПА, axПА) и реакции pG (afПА, asПА), термо- (axПА, afПА, ttПА) и щелочной стабильности (afПА, bmПА, kcПА), а также эффективности ацильного переноса (PAS2, krПА).

С помощью белковой инженерии на сегодняшний момент получены ПА с улучшенной специфичностью к C α -замещенным ФУК (bF24A, aF146Y), стереоспецифичностью (bF24X, aF146X), каталитической активностью (NEGM-ПА, bG70D, bF71L, bF71C, afПА T206G+S213G), термо- («B10», kcПА M168A, aW25Y, aA80R, aT150N, bA84P, bL100E, bA305D, bT311P+bQ312A, bN348D, bV359LbV400L, bmПА bK427A, bmПА bK430A), pH- (bF71C, bF71L, bW431) и операционной стабильностью (bmПА bK427A, bmПА bK430, afПА T206G+S213G). Мутанты есПА по остаткам bF24, aF146, aF145, aD148, bG375, а также гибридные 6G8, 73C4, 6B11, превосходят есПА ДТ по эффективности ацильного переноса в реакциях синтеза бета-лактамных антибиотиков.

Однако, многие найденные или полученные ПА, обладая каким-либо полезным свойством, отличным от есПА ДТ, «утрачивают» другие, например, приобретая преимущества в эффективности синтеза, теряют в каталитической активности. Так, наилучшие в синтезе бета-лактамных антибиотиков мутанты на основе bF24A практически полностью утратили амидазную активность и не могут использовать D-ФГА в качестве ацильного донора. Для других препаратов, превосходящих есПА ДТ по эффективности ацильного переноса (β) и относительной специфичности (α), суммарные эффекты недостаточны для проведения препаративного синтеза. На сегодняшний момент нет препаратов с приемлемой стереоселективностью по отношению к ряду первичных аминов и аминокислот, есПА ДТ нестабильна в щелочной среде, которая необходима для проведения эффективного ацилирования аминосоединений, а также в пептидном синтезе. Неизвестны препараты есПА устойчивые при высоких концентрациях реагентов, что ограничивает препаративные возможности пептидного синтеза с использованием ПА. В связи с вышеобозначенными потребностями представляется необходимым поиск более эффективных препаратов на основе есПА.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Материалы и оборудование

Перечень используемых материалов приведен ниже.

Ферменты: Набор для проведения высокоточного ПЦР: Taq ДНК-полимераза + Pfu ДНК-полимераза, High Fidelity PCR Enzyme Mix, 5ед/мкл, Fermentas, США; Taq ДНК-полимераза, 5ед/мкл, Fermentas, США; Набор эндонуклеаз рестрикции: AclI, AluI, AlwNI, BclI, BglII, BsaI, DpnI, EcoRI, EcoRV, HindIII, NcoI, NdeI, NruI, PvuI, 10ед/мкл, (а также серии Fast Digest[®] для быстрого гидролиза), Fermentas, США; T4 ДНК-лигаза: 5ед/мкл, Fermentas, США.

Штаммы E.coli: TG-1 (supE hsdΔ5 thi Δ(lac-proAB) F⁺[traD36 proAB+ lacIq lacZΔM15]); XL1-Blue (recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [*F'*proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)]).

Реактивы для молекулярной биологии: Набор dNTP: dATP, dTTP, dGTP, dCTP, 100мМ, Хеликон, Россия; Маркер молекулярного веса ДНК: 5000-100нп, 4нг/мкл, FastRuler Middle Range DNA Ladder, Fermentas, США; 1000-100нп, 10-1.25нг/мкл, FastRuler Express Forward DNA Ladder Mix, Fermentas, США; Краска для электрофореза: раствор с красителями для нанесения на гель (бромфеноловый синий, ксилен циановый FF, оранжевый Ж), 6x TriTrack DNA Loading Dye; Буфер для электрофореза: 50x TAE Electrophoresis Buffer, Fermentas, США; Этидий бромистый: 10мг/мл, BG, Хеликон, Россия; Агароза: BG, Хеликон, Россия; Наборы для выделения и очистки ДНК: Емкость колонки 25мкг ДНК, Цитокин, Россия; Среда LB: LB Broth, Miller, TCG, Amersco, США; Дрожжевой экстракт бессолевой: Хеликон, Россия; Агар: В, Хеликон, Россия; Хлорамфеникол*: >99%, Sigma, США; Набор для трансформации: Transform Aid[™], Fermentas, США; IPTG: AG, Хеликон, Россия; Сахароза: Panreac, Испания; ЭДТА: >99.0%, AppliChem, Германия; Бутил-тойоперл 650 М: Тоюо Soda, Япония; Глицерин: >99.0%, Panreac, Испания; Маркер молекулярного веса белков: 19-118кДа, Prestained Protein Molecular Weight Marker, Fermentas, США; Акриламид: SG, Extra pure, Хеликон, Россия; Бис-акриламид: UPG, EP, Хеликон, Россия; Аммония персульфат: ACS, Хеликон, Россия; TEMED: >99%, Хеликон, Россия; бета-меркаптоэтанол: BG, >99.0%, Хеликон, Россия; Бромфеноловый синий: ACS, Хеликон, Россия; Кумасси бриллиантовый

синий G250: UPG, Хеликон, Россия; Трифторуксусная кислота: 99%, EP, Acros Organics, США.

Реактивы для кинетики: м-карбокси-п-нитроанилид ФУК (NIPAB): >98%, Sigma, США; Бура: ХЧ, Химмед, Россия; CAPS: Sigma, США; ОФА: Koch Light, Великобритания; ФМСФ: BG, Merck, США; 6-АПК, 7-АДЦК, ампициллин, амоксициллин, цефалексин, D-ФГА, D-ФГ, п-ОН-D-ФГА, п-ОН-D-ФГ, п-ОН-D-ФГМ, D-ФГ-Глицин, R-NMC: ХЧ, предоставлены лабораторией ферментативной модификации физиологически активных соединений, НИИ ФХБ имени А.Н.Белозерского.

Реактивы общего назначения: Трис-НСl: >99.0%, Panreac, Испания; Аммония сульфат: ХЧ, Диаэм, Россия; Калий фосфорнокислый однозамещенный: ЧДА, Химмед, Россия; Калий фосфорнокислый двузамещенный: ЧДА, Химмед, Россия; Азид натрия: >99.0%, Acros Organics, США; SDS: BG, >99.5% Amersco, США; Спирт изопропиловый: ОСЧ, Экос-1, Россия; Спирт метиловый: LC, J.T.Baker, Нидерланды; Спирт этиловый: 95-96%, ректификат, Россия; Соляная кислота: ОСЧ., Сигма-Тек, Россия; Натрий едкий: ЧДА, Химмед, Россия; Кислота уксусная, ледяная: ХЧ, Химмед, Россия; Ацетонитрил: Сорт 1, Криохром, Россия.

Аббревиатуры: BG – Biotechnology Grade, TCG – Tissue Culture Grade, B – Bacteriological, AG – Analytical Grade, SG – Standard Grade, EP – Extra Pure, UPG - Ultra Pure Grade, ACS - American Chemical Society Grade, LC – HPLC Gradient Grade.

* Также нами были протестированы аптечные препараты, содержащие в своей основе хлорамфеникол: Левомецетин таблетированный (ОАО «Фармстандарт – Томскхимфарм»), Раствор левомецетина спиртовой 3% (ОАО «Тверская фармацевтическая фабрика»), Раствор левомецетина спиртовой 3% (ОАО «Ивановская фармацевтическая фабрика». При сравнении данных препаратов на предмет роста культуры *E.coli* на агаризованной среде с добавлением антибиотика было обнаружено, что препарат Ивановской фабрики не пригоден для использования.

Перечень используемого оборудования приведен ниже.

Оборудование для молекулярной биологии: Качалка термостатируемая: Excella F24R, New Brunswick, США; Автоклав: Tuttnauer 2540 МК, Израиль; Центрифуга рефрижераторная:

5810R, Eppendorf, Германия; Ламинарный шкаф: Nu 440-400E, NuAire, США; ПЦР-амплификатор: MasterCycler personal, Eppendorf, Германия; Холодильник низкотемпературный: GFL-6485, GFL, Германия; Хроматографическая система для очистки белков: Pharmacia Biotech, Швеция; Трансиллюминатор: Benchtop 3-UV Transilluminator, UVP, США/Англия; Ячейка для концентрирования: М-3, Amicon, США; Термостат твердотельный: ТТ1 Гном, НПО ДНК-Технологии, Россия; Камера для горизонтального электрофореза: Mini-Sub cell GT, Biorad, США; Камера для вертикального электрофореза в ПААГ: Mini-Protean TETRA, Biorad, США; Источник питания: Эльф-4, НПО ДНК-Технологии, Россия; Насос перистальтический: Miniplus 2, Gilson, Франция.

Оборудование для анализа: Жидкостной хроматограф высокого давления: Series 200, Perkin Elmer, США; Спектрофотометр: UV-1601, Shimadzu, Япония.

Оборудование общего назначения: Центрифуга: Minispin plus, Eppendorf, Германия; Сухожаровой шкаф: MOV-112, Sanyo, Япония; Холодильник бытовой: ХМ-6026, Атлант, Беларусь; Холодильный шкаф: ШВ-0.4-20, Атлант, Беларусь; Весы лабораторные до 50 г: LA-60, Acculab, Германия; Весы лабораторные до 200 г: PM-200, Mettler, Швейцария; Термостат водный: ТМ-2.02, Elmi, Латвия; Мультивортекс: V-32, Biosan, Латвия; Шейкер: Multi Bio 3D, Biosan, Латвия; Магнитная мешалка с подогревом: Mr 3001, Heidolph, Германия; рН-метр: Эксперт 001, Эконикс-Эксперт, Россия; Микроволновая печь: NN S554MF, Panasonic, Китай.

2.2 Методы

2.2.1 QuikChange ПЦР мутагенез

Проведение полимеразной цепной реакции [109; 110].

Лиофилизат праймеров растворяли в MQ воде до концентрации 100 мкМ и нагревали в течение 5 мин при температуре 95°C для разрушения вторичных структур. Затем по 1 мкл соответствующих праймеров в концентрации 2 мкМ добавляли к раствору «ПЦР-премикса», содержащему 1 мкл плазмиды, взятой в концентрации 20 нг/мкл, 5 мкл 2 мМ dNTP, 5 мкл 10-кратного полимеразного буфера и 36,5 мкл MQ воды. После чего в реакционную смесь добавляли 0,5 мкл смеси высокоточных ДНК-полимераз (High Fidelity PCR Enzyme Mix, Fermentas) в концентрации 2,5 ед. Все операции осуществляли на холоду. Амплификацию ДНК проводили при использовании программируемого термостата (Mastercycler, Eppendorf, Germany) по следующей программе:

1 цикл: 3 мин при 95°C

16 циклов: 0,5 мин при 95°C, 0,75 мин при 60°C, 12 мин при 72°C

1 цикл: 5 мин при 72°C

Для получения двойных мутантов готовили ПЦР-смеси для каждой из двух пар праймеров, как описано выше, в объеме 25 мкл, добавляли 0,25 мкл смеси высокоточных ДНК-полимераз в концентрации 2,5 ед. и проводили 4 цикла нагревания – охлаждения по аналогичной программе. Затем реакционные смеси объединяли, вновь добавляли 0,25 мкл смеси высокоточных ДНК-полимераз и проводили 18 циклов нагревания – охлаждения.

Проведение рестрикции матричной цепи

После амплификации 10 мкл реакционной смеси инкубировали с 1 мкл рестриктазы DpnI (FastDigest® DpnI, Fermentas) в общем объеме 20 мкл при 37°C в течение 0,5 часа.

Трансформация и клонирование

К 50 мкл компетентных клеток *E.coli* TG-1 (в некоторых случаях XL1-Blue) добавляли 10 мкл рестрикционной смеси и выдерживали во льду в течение 0,5 часа. Тепловой шок проводили при инкубировании смеси в течение 1,5 мин при 42°C, с последующим

охлаждением во льду в течение 2 мин. Затем добавляли 250 мкл LB среды и инкубировали на шейкере при 37°C в течение 0,5 часа. Далее 100 мкл клеток растирали на агаризованных чашках Петри, содержащих хлорамфеникол в концентрации 68 мг/л. Не менее чем через сутки 3 клона переносили в пробирки с 2 мл LB среды, содержащей хлорамфеникол в концентрации 68 мг/л. Пробирки инкубировали в течение ночи при 37°C при перемешивании на скорости 200 об/мин. Затем ночные культуры разделяли на две части. Первую часть использовали для наработки (170 мг/л хлорамфеникол, 10-12 часов), выделения (GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit, Fermentas) и секвенирования плазмиды (сервис компании «Евроген»). Вторую часть оставляли для экспрессии, выделения и очистки пенициллинацилазы.

2.2.2 ПЦР мутагенез с перекрыванием

Проведение полимеразной цепной реакции [111; 112]

Соответствующие праймеры с концентрацией 1,25 пмоль/мкл добавляли к плазмиде, содержащей модифицируемый ген, с концентрацией 1 нг/мкл в присутствии 2,5 мМ dNTP и 10-кратного полимеразного буфера. Объем реакционной смеси составлял 30 мкл. Затем в пробирку добавляли масло и смесь прогревали 3 минуты без ДНК-полимеразы при 95°C. После чего в реакционную смесь добавляли 1 мкл ДНК-полимеразы (2,5 ед/мкл) и проводили 25 циклов нагревания – охлаждения при следующих условиях: 1 мин при 95°C, 1 мин при 59°C (температура отжига варьировалась в зависимости от праймеров, используемых в реакции), 1 мин при 72°C.

Рестрикция фрагментов ДНК

Рестрикцию фрагментов ДНК проводили в течение 1-2 час в соответствующем буфере при 37°C в суммарном объеме 20 мкл. Для гидролиза фрагментов ДНК (200 нг/мкл) добавляли 2-4 ед. рестриктазы. Рестриктазы добавляли в два этапа. Половину от используемого количества рестриктаз вносили в реакцию сразу, а вторую половину - через 45 мин после начала протекания реакции, что обеспечивало исчерпывающий гидролиз фрагментов. Полноту рестрикции контролировали при помощи электрофореза в 1% агарозном геле.

Рестрикция плазмидной ДНК

Рестрикцию плазмидной ДНК (300 нг/мкл) проводили в течение 1-2 часов в присутствии 2-4 ед рестриктазы в соответствующем буфере при 37°C в суммарном объеме 20 мкл. Полноту протекания реакции контролировали при помощи электрофореза. Выделение

рестриционных фрагментов: Фрагменты ДНК, полученные после рестрикции, разделяли электрофорезом в 1% агарозном геле. Нужный фрагмент вырезали из геля при освещении длинноволновым ультрафиолетом (365 нм). Дальнейшее выделение ДНК проводили с помощью соответствующего набора реагентов по методике фирмы-производителя.

Лигирование фрагментов ДНК

Лигирование фрагментов ДНК проводили с помощью T4 ДНК-полимеразы по методике фирмы-производителя. Соотношение расщепленной векторной ДНК и вставляемого фрагмента составляло 1:3. Полученной лигазной смесью (5 мкл) трансформировали компетентные клетки *E.coli* XL1-Blue.

2.2.3 Нарботка биомассы

Нарботку биомассы клеток *E.coli* TG-1 с ПА проводили при 15°C в течение 50-60 ч в качалочных колбах на 500 мл с отбойниками. Объем колбы содержал 50 мл среды 2YT (16 г/л триптона, 10 г/л дрожжевого экстракта и 5 г/л NaCl, pH 7,5) или YE (7,5 г/л дрожжевого экстракта, pH 7,5) с хлорамфениколом в концентрации 68 мкг/мл. Дополнительно в культуральную среду вносили CaCl₂ (2 мМ) и глицерин (5 г/л). В качестве индуктора биосинтеза ПА использовали IPTG с конечной концентрацией 0,1 мМ. Индукцию начинали при достижении A₆₀₀ = 0,6-0,8.

2.2.4 Выделение и очистка мутантных препаратов ПА

Разрушение клеток при помощи ультразвука

1,5 мл суспензии клеток осаждали центрифугированием в течение 2 мин при 5000 об/мин. Ресуспензировали в 1/10 буфера Л (0,05 М ФБ, pH 7,5, 0,1 мг/мл лизоцима). Замораживали 5 мин в морозильной камере при -70°C. Размораживали при комнатной температуре. Дезинтегрировали 15 мин на ультразвуковой бане при 20 кГц и 160 Вт в режиме: 1 мин. ВКЛ/1 мин. ВЫКЛ. Центрифугировали в течение 2 мин при 14000 об/мин. Измеряли специфическую активность в супернатанте.

Выделение при помощи осмотического шока

Клетки осаждали центрифугированием в течение 20 минут при 3500 об./мин и 4°C. Супернатант отделяли и осадок ресуспендировали в 1/10 объема осмотического шокового

буфера А (20% сахара, 0,1 М Трис-НСl, 10 мМ ЭДТА, рН 8,0), охлаждённого до 0°C, и центрифугировали 10 минут при 7000 об./мин и 4°C. Супернатант отделяли и осадок ресуспендировали в 1/10 объёма осмотического шокового буфера В (1 мМ ЭДТА, рН 8,0) охлаждённого до 0°C, и центрифугировали 15 минут при 9000 об/мин и 4°C. К полученному супернатанту добавляли 1 М ФБ рН 7,0, до конечной концентрации 0,05 М (Раствор 1).

Очистка в градиенте сульфата аммония

К раствору 1 добавляли сульфат аммония до конечной концентрации 1,5 М. Затем на 15 мин ставили раствор на качалку для формирования осадка. Центрифугировали раствор 15 мин при 12000 об/мин. К супернатанту добавляли охлажденный раствор сульфата аммония до концентрации 2,9 М. На 15 мин оставляли раствор на качалке. Центрифугировали раствор 15 мин при 12000 об/мин. Ресуспензировали осадок в 10 мл буфера 2 (0,05 М ФБ, 0,02 % NaN₃, рН 7,5). Затем концентрировали и обессоливали в центрифужных концентраторах Millipore 30 кДа 2 раза по 10 мин при 4000 об/мин. Все процедуры проводили при охлаждении (центрифужный термостат, ледяная баня).

Очистка при помощи гидрофобной хроматографии

К раствору 1 добавляли сульфат аммония до конечной концентрации 1,5 М. Далее, наносили образцы на колонку с Бутил-тойоперл 650М, уравновешенную буфером 1 (0,05 М ФБ, 1,5 М (NH₄)₂SO₄, 0,02% NaN₃, рН 7,5) и элюировали в линейном градиенте 1,5-0 М (NH₄)₂SO₄ при использовании буфера 2 (0,05М ФБ, 0,02% NaN₃, рН 7,5). Фермент элюировался при концентрации (NH₄)₂SO₄ равной 1 М. Фракции, обладающие пенициллинацилазной активностью, объединяли, обессоливали на колонке HiTrap Desalting и концентрировали в ячейке для ультрафильтрации с использованием мембраны Millipore на 30 кДа.

К полученным препаратам добавляли глицерин до 10% и оставляли в холодильнике при +4°C, если ферментный препарат использовался для дальнейших исследований, или в морозильной камере при -20°C, если было необходимо длительное хранение препарата.

2.2.5 Приготовление компетентных клеток

Одну колонию *E.coli* TG-1 переносили в 2,5 мл LB среды и инкубировали ночь при 37°C. Весь объем ночной культуры переносили в 250 мл LB среды, добавляли MgSO₄ до

концентрации 20 мМ и подращивали до оптической плотности $OD_{600}=0,4-0,6$ (обычно 5-6 часов). Затем центрифугировали клетки при 4500 g 5 мин при охлаждении до 4°C. Аккуратно ресуспендировали осадок охлажденным раствором TFB1 (40% от исходного объема, 30 мМ CH_3COOK , 10 мМ $CaCl_2$, 50 мМ $MnCl_2$, 100 мМ $RbCl$, 15% глицерин, pH 5,8, стерилизованный через 0,2 мкм фильтр) и оставляли на холоду (+4°C) в течение 5 мин. Затем снова центрифугировали клетки в том же режиме и аккуратно ресуспендировали осадок охлажденным раствором TFB2 (4% от исходного объема, 100 мМ MOPS, 75 мМ $CaCl_2$, 10 мМ $RbCl$, 15% глицерин, pH 6,5, стерилизованный через 0,2 мкм фильтр). Инкубировали клетки во льду в течение 15-60 мин, разделяли на аликвоты по 100 мкл и замораживали при -70°C. Все операции совершали на холоду, предварительно охлаждая все емкости и пипетки.

2.2.6 Электрофорез в агарозном геле

Электрофорез молекул ДНК проводили в TAE буфере (40 мМ Трис, 20 мМ CH_3COOH , 1 мМ ЭДТА) в 1% агарозном геле. Для окрашивания образцов использовали TriTrack™, в составе которого имеется 3 красителя (бромфеноловый синий, ксилен циановый ФФ, оранжевый Ж), мигрирующих с разными скоростями. В качестве маркеров молекулярного веса использовали набор FastRuler™ (5000-100 Да, 4 нг/мкл), для аналитических целей использовали набор MassRuler™ (10000-100 Да, 1-10 нг/мкл). Окрашивание геля проводили в растворе бромистого этидия с концентрацией 0,5 мкг/мл. Визуализировали полосы при 254 нм. В качестве альтернативы использовали менее чувствительный (при 254 нм), но более безопасный (по результатам исследований фирмы производителя [113]) краситель Sybr® Safe.

2.2.7 Электрофорез в полиакриламидном геле

Денатурирующий SDS-электрофорез для разделения белков по Лэммли проводили при использовании следующих растворов:

1. Акриламид/бисакриламид (30%Т, 2,67%С)
2. 10% SDS
3. Буфер 1: 1,5 М Трис-НCl, pH 8,8
4. Буфер 2: 0,5 М, Трис-НCl, pH 6,8

Состав гелей: Разделяющий 12% гель: 3,4 мл H₂O дист., 4,0 мл раствора 1, 2,5 мл раствора 3, 0,1 мл раствора 2. Концентрирующий 6% гель: 5,4 мл H₂O дист., 2,0 мл раствора 1, 2,5 мл раствора 4, 0,1 мл раствора 2.

Для инициации полимеризации непосредственно перед заливкой геля к 10 мл раствора мономеров добавляли 50 мкл 10% персульфата аммония и 5 мкл ТЕМЕД.

Состав буфера для нанесения пробы (восстанавливающий буфер с SDS):

1. H₂O дист. - 3,55 мл
2. 0.5 М Трис-НСl, рН 6,8 - 1,25 мл
3. Глицерин - 2,5 мл
4. 10% SDS - 2,0 мл
5. 0,5% бромфеноловый синий - 0,2 мл

50 мкл βМЭ добавляли к 950 мкл буфера для нанесения пробы. Разводили образец буфером для нанесения в пропорции по меньшей мере 1:2 и прогревали при 95°C в течение 4 мин.

В качестве маркера использовали смесь Prestained Protein Molecular Weight Marker, содержащую набор следующих белков: β-галактозидаза (118 кДа), бычий альбумин (90 кДа), овальбумин (43 кДа), карбоангидраза (34 кДа), β-лактоглобулин (26 кДа), лизоцим (19 кДа).

Электрофорез проводили при 15 мА для концентрирующих условий и при 30 мА для разделяющих на протяжении 45-60 мин. Для визуализации полос белка отделенный от стеклов гелем помещали на 30 мин в раствор 5 (0,3 % Кумасси R250, 1 CH₃COOH:3 C₂H₅OH:6 H₂O) при перемешивании. Для отмывки использовали горячие растворы 6 (50% C₂H₅OH, 10% CH₃COOH) и 7 (7% CH₃COOH, 5% C₂H₅OH). Раствор 7 можно использовать для хранения гелей. Чувствительность окраски с помощью Кумасси R250 составляет 1 мкг белка в полосе.

Нативный электрофорез проводили в аналогичных условиях при полном отсутствии SDS во всех компонентах системы, без добавления βМЭ, а также без последующего нагревания пробы.

2.2.8 Секвенирование

Секвенирование проводили на секвенаторе Applied Biosystems 3730 XL DNA Analyzer (сервис компании «Евроген»). Чтению подвергался участок 700-900 п.н. (регулярно получаемая дальность прочтения 500-600 нуклеотидов), содержащий вводимую мутацию.

2.2.9 Титрование активных центров

Абсолютную концентрацию активных центров полученных мутантов ПА определяли титрованием препарата фермента необратимым ингибитором ФМСФ, как описано ранее [51]. К препаратам пенициллинацилазы добавляли свежеприготовленный водный раствор ФМСФ определенной концентрации. Смесь инкубировали в 10 мМ фосфатном буфере (рН 6,5) в течение 10 минут. Остаточную активность определяли в реакции гидролиза цветного субстрата NIPAB ($1 \cdot 10^{-4} \text{М} \approx 4K_M$ для ПА *E.Coli*) в 0.1М фосфатном буфере (рН 7,5; 25°C). Операцию повторяли 7÷12 раз до полной инактивации фермента. Концентрацию активных центров пенициллинацилазы в препарате определяли из линейной регрессии как значение концентрации ингибитора в инкубационном растворе, при которой достигается полная потеря ферментативной активности.

2.2.10 Определение кинетических параметров гидролиза цветного субстрата

Активность фермента определяли на спектрофотометре по поглощению окрашенного продукта реакции гидролиза NIPAB на длине волны 400 нм. Кинетические параметры гидролиза NIPAB, катализируемого нативной и мутантными ПА, определяли при анализе зависимости начальных скоростей гидролиза от концентрации субстрата в кинетическом буфере (0,01 М ФБ, 0,1 М КСl, рН 7,5) при 25°C. Результаты серии 8-10 измерений начальной скорости при концентрациях субстрата в интервале $1 \cdot 10^{-5} \div 2 \cdot 10^{-4} \text{М}$ обрабатывали методом регрессионного анализа в прямых координатах функцией $V_0 = k_{\text{kat}} \cdot S_0 \cdot E_0 / (K_M + S_0)$.

2.2.11 Изучение рН- и термостабильности

Термоинактивацию мутантов ПА и нативного фермента исследовали при 50°C и рН 7,5 (в некоторых случаях при рН 7,0) в 0,01 М фосфатном буфере (в некоторых случаях значение ионной силы поддерживалось внесением 0,1 М КСl). Щелочную стабильность определяли в 0,01 М боратном буфере с рН 10,0 при добавлении 0,1 М КСl, а также в 0,1

CAPS буфере при pH 11,0. Кислотную стабильность определяли в 0,1 М ацетатном буфере с pH 4,0. Раствор фермента в концентрации $1 \cdot 10^{-7}$ М инкубировали в термостатируемой ванне термостата. Через определенные промежутки времени отбирали 20 мкл. раствора и проводили спектрофотометрическое измерение остаточной активности, как описано выше. Значения константы инактивации (k_{in}) рассчитывали при интерполяции полученной зависимости приведенной остаточной активности (A/A_0) от времени инкубирования (t) функцией $A/A_0 = \exp(-k_{in} \cdot t)$, соответствующей первому порядку реакции.

2.2.12 Ингибиторный анализ

При проведении ингибиторного анализа измеряли приближенное значение k_{kat}/K_M как тангенс угла наклона зависимости скорости гидролиза NIPAB от концентрации субстрата. Значение скорости определяли для трех концентраций, соответствующих $0,1 K_M - 0,3 K_M$ для NIPAB. Подобные измерения проводили для трех концентраций ингибитора, причем концентрацию ингибитора подбирали таким образом, чтобы можно было зафиксировать уменьшение k_{kat}/K_M не менее чем в 2 раза. Измерение скорости гидролиза NIPAB проводили в соответствии с 2.2.9.

2.2.13 Определение параметра S/H

В отдельной емкости (обычно фалькон на 15-50 мл) смешивали навески сухих препаратов 6-АПК и донора ацильной части (D-ФГА, п-ОН-D-ФГА, D-ФГМ, п-ОН-D-ФГМ) в эквимолярном соотношении в концентрации 50 мМ, если не указано иное. Добавляли приблизительно 9/10 требуемого объема H_2O дист. Доводили pH 6,3. Затем добавляли остаток H_2O дист. с учетом последующего разбавления за счет внесения фермента. 1,9 мл смеси переносили в термостатируемую ячейку (30°C). Реакцию начинали внесением 100 мкл фермента (обычно в концентрации $5,0 \cdot 10^{-7}$ М). pH поддерживали раствором NaOH с заранее подобранной концентрацией при постоянном перемешивании. По ходу синтеза отбирали аликвоты 20 мкл, останавливая реакцию добавлением CH_3CN . Далее разбавляли реакционную смесь элюентом и проводили ВЭЖХ анализ. Реакцию проводили до степеней превращения не более 10% по ацильному донору.

По отношению начальных скоростей накопления продукта синтеза (целевого антибиотика) и непродуктивного гидролиза (D-ФГ или п-ОН-D-ФГ) определяли параметр S/H.

2.2.14 Определение параметров β и γ

Реакцию синтеза антибиотика проводили аналогично 2.2.13. При фиксированной концентрации ацильного донора варьировали содержание 6-АПК в системе в диапазоне от 30 до 200 мМ. Для каждой концентрации 6-АПК определяли отношение начальных скоростей синтеза антибиотика и непродуктивного гидролиза (S/H). Далее, интерполировали полученные зависимости S/H от концентрации 6-АПК модифицированной гиперболической функцией $S/H = \beta \cdot [6\text{-АПК}] / (1 + \beta \cdot \gamma \cdot [6\text{-АПК}])$ и находили параметры β и γ .

2.2.15 Определение параметра α

При совместном гидролизе реакции проводили аналогично 2.2.13. В качестве исходных компонентов брали растворы антибиотика (ампициллин, амоксициллин) и ацильного донора (D-ФГА, п-ОН-D-ФГА, D-ФГМ, п-ОН-D-ФГМ). pH 6,3 поддерживали при помощи 10мМ ФБ. Концентрации реагентов подбирали для каждого мутанта отдельно в ходе предварительного эксперимента таким образом, чтобы начальные скорости накопления продуктов гидролиза в основном эксперименте были сопоставимы. Для системы D-ФГА/ампициллин начальные концентрации составляли величину 1 мМ/0,1 мМ. Степень накопления продуктов гидролиза не превышала 10%. Параметр относительной специфичности α определяли по отношению начальных скоростей накопления соответствующих продуктов гидролиза в пересчете на исходные концентрации реагентов. См. также раздел 3.5.2.

При раздельном гидролизе реакции проводили в отдельных ячейках. Температура (30°C), концентрация фермента ($1,0 \cdot 10^{-8}$ М), концентрация реагентов ($5,0 \cdot 10^{-4}$ М) в параллельных экспериментах была одинаковой. Параметр α определяли по отношению начальных скоростей гидролиза антибиотика и ацильного донора.

2.2.16 Определение максимального выхода реакции

В термостатируемой ячейке смешивали сухие препараты 6-АПК (0,05 М) и ацильного донора (0,05 М). Фермент добавляли до концентрации $2,0 \cdot 10^{-6}$ М. Аликвоты по 20 мкл отбирали в течение 2-4 часов. Реакцию останавливали не менее чем через 1 час после достижения максимальной концентрации антибиотика (ВЭЖХ контроль).

2.2.17 Определение стереоселективности в реакции ацилирования 2-аминобутанола и фенилаланинола

Для реакции ферментативного ацилирования смешивали рацемат 2-АБ или ФА и донор ацильной части (S-МК или R-МК амиды) в концентрации 50 мМ в общем объеме 2 мл, доводили рН 9 раствором NaOH и вносили фермент в концентрации $5 \cdot 10^{-7}$ М. Реакцию проводили в термостатируемой ячейке (25°C) при постоянном перемешивании, поддерживая рН в ходе реакции. Аликвоты 20 мкл отбирали в течение 60-90 мин. Степень превращения при этом не превышала 10%. Затем, останавливали реакцию в ацетонитриле, выполняли серию разбавлений и анализировали на ВЭЖХ.

Стереоселективность (Е) определяли как отношение начальных скоростей синтеза N-манделилов R- и S-2-АБ или ФА. Параметр S/N определяли по отношению начальных скоростей суммарного накопления продуктов переноса и миндальной кислоты.

2.2.18 Определение стереоселективности в реакции гидролиза фенилацетилфенилаланинола

Реакцию ферментативного гидролиза 50 мМ рацемата N-фенилацетилфенилаланинола проводили в общем объеме 2 мл при добавлении фермента до концентрации $5 \cdot 10^{-7}$ М. Реакционную смесь выдерживали в термостатируемой ячейке (25°C) при постоянном перемешивании, поддерживая рН 8,0. Аликвоты по 100 мкл отбирали в течение 60-100 мин. Останавливали реакцию в 200 мкл ацетонитрила. Степень превращения не превышала 10%.

Полученные 300 мкл реакционной смеси разделяли на две равные части. Первую часть без разбавления анализировали на системе ВЭЖХ 2, с целью слежения за накоплением ФУК для определения начальной скорости ферментативного гидролиза. Для предколонной модификации свободных аминогрупп, с целью слежения за накоплением образующихся отдельных энантиомеров фенилаланинола, ко второй части реакционной смеси добавляли 100 мкл о-фталиевого альдегида (20 мМ) и 100 мкл хирального тиола R-NMC (60 мМ), а также 650 мкл 0,2 М боратного буфера (рН 9,0). Смесь выдерживали в течение не менее 15 минут и анализировали образующиеся диастериомерные изоиндолы на ахиральной стационарной фазе системы ВЭЖХ 1. Из полученных хроматограмм вычисляли отношение площадей изоиндолов, соответствующих R- и S-ФА. При помощи материального баланса по

накоплению ацильной (ФУК) и амидной части (R- и S-фенилаланинол) приводили отношения площадей к действующим концентрациям энантиомеров в системе.

Стереоселективность определяли как отношение начальных скоростей накопления R- и S-фенилаланинола. Параметр S/N определяли по отношению начальных скоростей суммарного накопления фенилаланинола и ФУК.

2.2.19 ВЭЖХ

Для определения действующих концентраций реакционных компонентов использовали ВЭЖХ систему Perkin Elmer 200 Series с колонкой для обращенно-фазовой хроматографии Phenomenex Luna 5u C-18 250·4,6 мм (ВЭЖХ 1, если не указано иное, *) и систему Милихром А-02 с колонкой Phenomenex Luna 3u C-18 50·3мм (ВЭЖХ 2). Аликвоты реакционной смеси переносили в элюент, разбавляли до концентрации порядка $1 \cdot 10^{-4}$ М и анализировали. Параметры ВЭЖХ анализа и время элюирования приведены в таблице 23.

Таблица 23. Параметры ВЭЖХ анализа и время элюирования компонентов реакционных смесей.

Синтез/гидролиз ампициллина

ВЭЖХ 1

элюент: 0,68 г/л KH_2PO_4 , 0,1 г/л SDS, pH 3,0, 28% CH_3CN

скорость потока: 0,5 мл/мин

детектирование: 210 нм

Компоненты:	Время удерживания (мин):
ФГ	7,2
6-АПК	9,2
D-ФГА	19,6
Ампициллин	28,5

Ацилирование R- и S-2-аминобутанола

ВЭЖХ 1

колонка*: Kromasil Eternity-5-C18, 4,6*250мм

элюент: 0,68 г/л KH_2PO_4 , 0,2 г/л SDS, pH 3,0, 20% CH_3CN

скорость потока: 1 мл/мин

детектирование: 210 нм

Компоненты:	Время удерживания (мин):
Амид миндальной кислоты	3,8
Миндальная кислота	4,6
S-манделил-S-2-аминобутанол	5,5
R-манделил-R-2-аминобутанол	5,5
S-манделил-R-2-аминобутанол	6,9
R-манделил-S-2-аминобутанол	6,9

Гидролиз R-и S-N-фенилацетилфенилаланинола

ВЭЖХ 1

элюент: 0,68 г/л KH_2PO_4 , pH 6,8, 29% CH_3CN

скорость потока: 0,5 мл/мин

детектирование: 340 нм

термостатирование: 45°C

Компоненты:	Время удерживания (мин):
изоиндолное производное S-фенилаланинола	36

ВЭЖХ 2

элюент: 0,68 г/л KH_2PO_4 , pH 3,0, градиент 0-80% CH_3CN

скорость потока: 0,2 мл/мин

детектирование: 210 нм

Компоненты:	Время удерживания (мин):
ФУК	7,6
R- и S- фенилацетилфенилаланинол	9,3

* Также нами были протестированы другие условия для системы ВЭЖХ 1: колонка - Kromasil eternity 2,5 μ , C18, 4,6·100мм, элюент - 57% ($\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O} = 50/50$, 0,2 г/л SDS), 43% (0,68 г/л ФБ, 0,2 г/л SDS pH 3,0), поток – 1 мл/мин, что позволило минимум вдвое сократить время анализа.

Для обработки экспериментальных данных использовали программное обеспечение *TotalChrom* (PerkinElmer, США) и *Милухром* (Россия).

2.2.20 Компьютерное моделирование

На основании численного решения задачи Коши методом Гира для схемы 1 в пакете математических программ *Maple 8* (Maplesoft) была построена математическая модель реакции ацильного переноса. Текст программы представлен в приложении 3.

Докинг субстратов в активный центр фермента, а также оценку энергии связывания проводили в программе *LeadFinder GUI 1.2.40.185* (BioMolTech, Inc). Структуры мутантов получали в программе *Mutate* (версия 1.0.2 билд 24.08, ООО "Молекулярные технологии"). Полноатомные структуры генерировали при помощи программы *BuildModel 1.2.0 билд 6.11* (BioMolTech, Inc). Визуализацию .pdb файлов осуществляли при помощи программ *PyMol 1.0r1* (DeLano Scientific LLC) и *VMD 1.8.7* (TCBG University of Illinois).

2.2.21 Методы статистической обработки результатов

Количественные значения целевых параметров (k_{cat} , K_M , k_{in} , α , β , γ , E) были представлены после статистической обработки экспериментальных данных в программах *Microsoft Excel 2007* (*Microsoft*) и *Sigma Plot 10.0* (*Systat Software, Inc*). За некоторым исключением, погрешности представленные в работе, представляют собой результат обработки массива данных единичного эксперимента. Значения погрешности, представленные в скобках, рассчитаны на основе усредненной погрешности в аналогичных экспериментах.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Постановка задачи

При анализе литературных и патентных источников по природным и мутантным ПА установлено, что на текущий момент существует потребность в получении фермента с увеличенной эффективностью в реакции синтеза бета-лактамных антибиотиков, а также увеличенной стабильностью в области щелочных рН и высоких концентраций реагентов. Также отсутствуют препараты ПА с достаточной стереоселективностью в отношении первичных аминов и аминокспиртов. Для решения данных проблем перспективным представляется использовать методы белковой инженерии. Ввиду того, что есПА является хорошо изученным объектом, наиболее целесообразно использовать подходы, основанные на первичном предсказании и последующем направленном мутагенезе.

При выборе точек для направленного мутагенеза могут быть использованы различные взаимодополняющие подходы, такие как визуальный анализ структуры, молекулярная динамика и докинг, биоинформатический анализ, анализ литературы и различные программы, например, по дизайну дисульфидных связей. С помощью таких подходов нами были выбраны горячие точки мутагенеза – одиночные мутации, которые представлены в таблице 24. Данные точки (рисунок 28) были распределены по всей структуре: в области активного сайта, на участках связывания ацильной части и нуклеофила, а также на периферии.

Таблица 24. Выбор горячих точек мутагенеза.

Метод	Мутация	Локализация
Анализ структуры	bS1T+bT68S	активный центр
	bI177V	участок связывания ацильной части
	bW154F	участок связывания ацильной части
	bF71A	участок связывания нуклеофила
	bL220E	периферия

Анализ структуры/ Молекулярная динамика	aS149R	участок связывания нуклеофила
	bN388Q	участок связывания нуклеофила
	bF256R	участок связывания нуклеофила
	bA255R	участок связывания нуклеофила
Биоинформатический анализ	bD484N	периферия
	bD484H	периферия
	bQ292R	периферия
	bR533C+bW500C	периферия
	bR297A	периферия
Литература	bF24A	участок связывания ацильной части
	bF71L	участок связывания нуклеофила
Другие программы (DbD, MODIP)	aA173C+bA410C	периферия

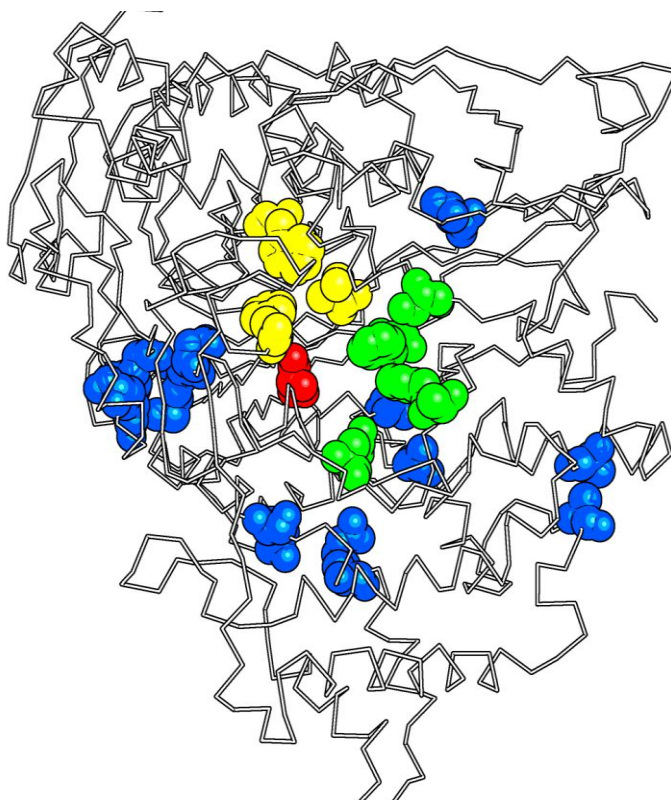


Рисунок 28 Локализация горячих точек мутагенеза. Красный – активный центр, желтый – участок связывания ацильной части, зеленый – участок связывания нуклеофила, синий – периферия.

Одиночные мутации в некоторых случаях объединяли при получении многоточечных мутантов. При этом руководствовались, с одной стороны, принципом накопления позитивных эффектов от отдельных мутаций, а с другой, получением целевого эффекта от комбинации мутаций. С этой целью нами рассматривались коррелирующие остатки, фиксирующие элементы, аналогии в родственных ферментах и дисульфидные мостики (таблица 25).

Таблица 25. Стратегии объединения мутаций

Одиночные мутации	Многоточечные мутации	Принцип объединения
bS1T, bS1C, bT68S	bS1T+bT68S bS1C+bT68S	Получение целевого эффекта от комбинации мутаций: <i>Коррелирующие позиции</i>
bQ292R, bI329	bQ292R+bI329E	<i>Фиксирующие мутации</i>
bW500C, bM485R, bR533C	bR533C+bM485R bR533C+bW500C bR533C+bW500C+bM485R	<i>Копирование из родственных ферментов</i>
	aA186C+bS243C bA306C+bV423C aA173C+bB410C	<i>Дисульфидные мостики</i>
bF256R, bF71L, bN388Q, bF24A, aS149R, aR145G	aR145G+bF256R bF24A+bF256R bF256R+bF71L bA255R+bF71L bN388Q+bF71L bF24A+bF71L bF256R+bS149R bF256R+bN388Q+bF71L bF24A+bF256R+bF71L	Объединение позитивных эффектов от одиночных мутаций
bR297A, bD484N, bD484H, bL220E, bF71A, bI177V, bW154F		нет

3.2 Получение генов мутантных форм

Для введения мутаций в ген есПА использовали сайт-направленный ПЦР мутагенез. Основная часть мутантов (25 клонов) была получена по схеме QuikChange™ ПЦР мутагенеза, другую часть (11 клонов) получали по классической схеме ПЦР мутагенеза с перекрытием.

Схему QuikChange ПЦР мутагенеза (схема 3) использовали при получении мутантов: bQ292R, bR297A, bD484N, bD484H, bI329E, bS1T, aT68S, aT68S+bS1T, bS1C, bS1C+bT68S, bQ292R+bI329E, bW500C, bM485R, bR533C, bR533C+bM485R, bR533C+bW500C, bR533C+bW500C+bM485R, bL220E, bF71A, bI177V, bW154F, aR145G+bF256R, aA186C+bS243C, bA306C+bV423C, aA173C+bB410C, bF24A+bF256R.

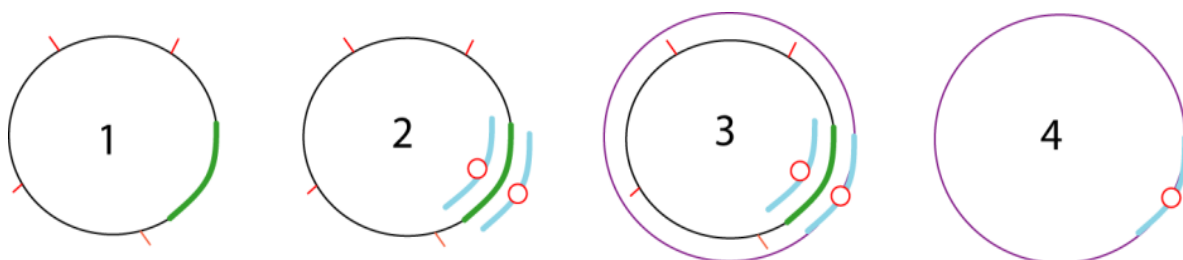


Схема 3: 1 — матричная метилированная плазмида, 2 — праймеры с мутациями на матричной плазмиде, 3 — образование дочерней плазмиды, несущей мутацию, 4 — дочерняя плазмида с мутацией, после DpnI гидролиза матричной плазмиды.

В соответствии со схемой 3 синтезировали два комплементарных праймера, содержащих мутацию в центре последовательности. Проводили амплификацию полноразмерной плазмиды, с последующим удалением метилированной матрицы при помощи рестриктазы DpnI. В качестве исходной матрицы в зависимости от задач служила или плазмида с геном есПА ДТ или же с геном одной из ранее полученных мутантных форм. В некоторых случаях многоточечные мутанты получали одновременно в два раунда ПЦР, как это описано в пункте 2.2.1.

Подготовку праймеров осуществляли в соответствии с следующими требованиями:

- 1) Прямой и обратный праймер отжигаются на одну и ту же последовательность по противоположным цепям плазмиды
- 2) Длина праймера составляет 25-45 нуклеотидов

- 3) Температура плавления праймеров: $T_m = 81.5 + 0.41(\%GC) - 675/N \geq 78^\circ\text{C}$
- 4) Желаемая мутация приходится на середину праймера, а расстояние до обоих концов составляет 10-15 нуклеотидов
- 5) Минимальный GC состав (%GC) не менее 40%
- 6) На концах праймера находится не менее 2-х G/C

В приложении 3 представлены праймеры для секвенирования (3.1), мутагенеза (3.2), а также фланкирующие праймеры (3.3).

В качестве полимеразы использовали смесь High Fidelity PCR Enzyme Mix (HF), которая оказалась более эффективной, чем рекомендуемая в [89] полимеразы Pfu (рис. 29).

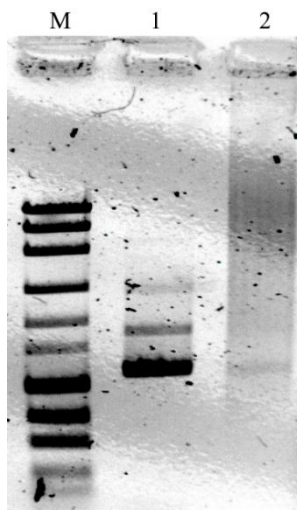


Рисунок 29. Сравнение эффективности полимераз HF (1-я дорожка) и Pfu (2-я дорожка).

Концентрацию праймеров, dNTP, матрицы, Mg^{2+} подбирали в отдельном эксперименте (рис.30). Было установлено оптимальное соотношение компонентов смеси (дорожка б): концентрация праймеров - 0,1 мкМ; концентрация dNTP - 2мМ; концентрация матрицы - 10 нг/мкл.

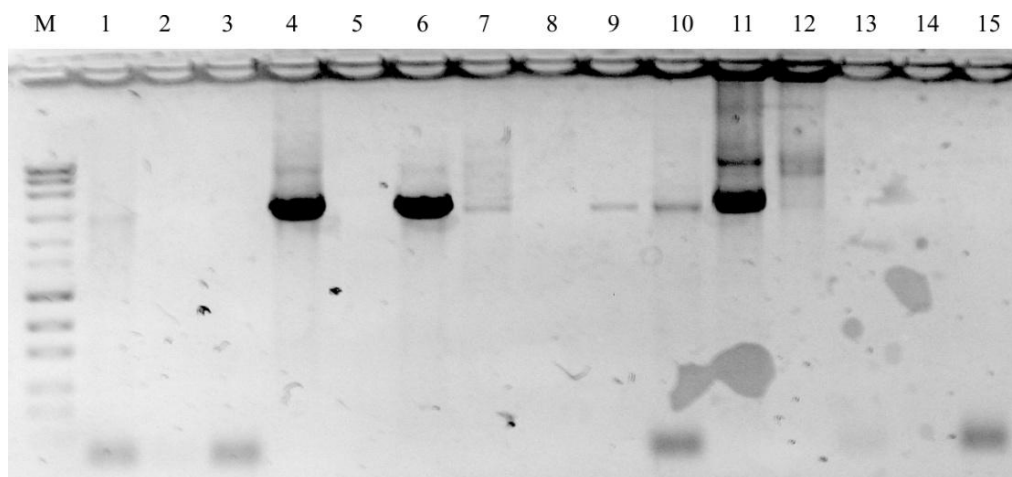


Рисунок 30. Оптимизация условий ПЦР.

При проведении QuikChange ПЦР реакции для контроля качества ПЦР, а также для апробации новых праймеров рекомендуется наряду с целевым ПЦР проводить дополнительный при внесении фланкирующих праймеров (рис.31).

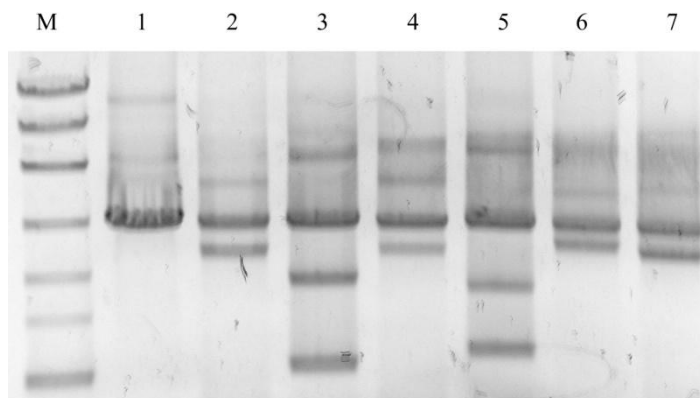


Рисунок 31. Дополнительный ПЦР с фланкирующими праймерами. Дорожка 1 – ПЦР без мутирующих праймеров, дорожки 2-7 – ПЦР с мутирующими праймерами.

Схему ПЦР мутагенеза с перекрытием (схема 4) использовали при получении мутантов: bQ292R, bN388Q, bF256R, bF24A, bA255R+bF71L, bF256R+bF71L, bN388Q+bF71L, bF24A+bF71L, bF256R+bS149R, bF256R+bN388Q+bF71L, bF24A+bF256R+bF71L. Данные мутанты, за исключением bQ292R, были получены к.х.н. Ясной А.С.

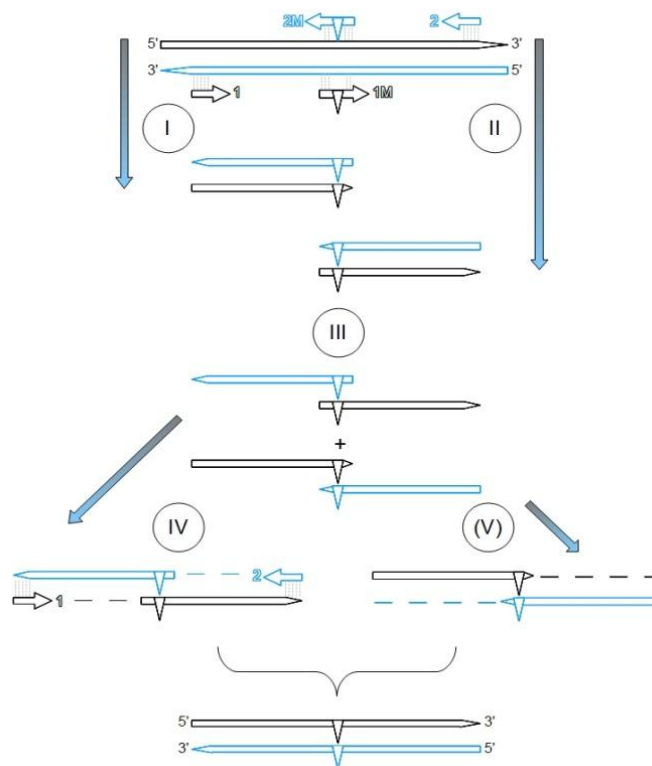


Схема 4. 1 — прямой фланкирующий праймер, 1М — прямой мутирующий праймер, 2 — обратный фланкирующий праймер, 2М — обратный мутирующий праймер.

I: ПЦР-амплификация левого фрагмента (1+2М); II: ПЦР-амплификация правого фрагмента (2+1М); III: очистка и объединение фрагментов; достройка 3'-концов (V) и амплификация целого фрагмента (1+2).

В соответствии со схемой 4 на область мутации синтезировали два праймера (к кодирующей и комплементарной цепям) так, чтобы их концы перекрывались и содержали вводимую мутацию. Также использовали два фланкирующих праймера, комплементарных последовательности гена по обе стороны от мутации и содержащие подходящие сайты рестрикции. В качестве исходной матрицы в зависимости от задач служила или плазида с геном есПА ДТ или же с геном одной из ранее полученных мутантных форм.

Таблица 26. Сравнение методик мутагенеза.

	<i>QuikChange ПЦР мутагенез</i>	<i>ПЦР мутагенез с перекрытием</i>
<i>Достоинства</i>	<ul style="list-style-type: none"> - высокая скорость получения мутантов (1 сутки до получения клонов с мутациями); - низкая стоимость за счет меньших расходов на праймеры и дополнительные ферменты; - отсутствие необходимости использования электрофореза; 	<ul style="list-style-type: none"> - возможность контроля на каждом этапе; - низкий уровень ошибок; - возможность оптимизации протокола для получения многоточечных мутантов; - 100% выход после трансформации;
<i>Недостатки</i>	<ul style="list-style-type: none"> - повышенная вероятность ошибки при амплификации всего вектора; - низкий выход клонов, содержащих мутантную плазмиду. В среднем 70% - для одиночных мутантов, 20% - для двойных мутантов. 	<ul style="list-style-type: none"> - использование 4-х праймеров; - оптимизация условий ПЦР для каждой новой пары праймеров; - необходимость использования специфических эндонуклеаз рестрикции; - необходимость выделения продуктов амплификации гена; - необходимость использования ферментов лигирования; - длительность (3-4 суток до получения клонов с мутациями).

На наш взгляд, в рутинных и скрининговых экспериментах для получения одиночных и двойных мутантов ПА следует отдавать предпочтение быстрому, дешевому и простому методу QuikChange ПЦР мутагенеза. Однако, необходимо подтверждать вводимые мутации с помощью секвенирования, не менее чем для трех клонов, и доказывать отсутствие

возможных ошибок на протяжении всего гена. При проведении полного секвенирования с пяти праймеров для трех случайным образом выбранных плазмид, полученных по методике QuikChange, нами были обнаружены немногочисленные равнозначные замены и 2 замены Ala->Thr. В одном случае это была замена в незначимой области межсубъединичного спейсера, в другом – в значимой части далеко от активного центра. Следует отметить, что на рынке полимераз появилась полимеразы Q5 (*New England Biolabs*), которая обеспечивает точность на порядок большую по сравнению с *Pfu*, что делает QuikChange ПЦР мутагенез еще более привлекательным.

В случаях, когда необходима высокая точность, и под рукой нет высокоточных полимераз, предпочтительнее использовать классический метод ПЦР-мутагенеза с перекрыванием. Для одновременного получения многоточечных мутантов этот метод в модификации [112] также представляется более эффективным.

3.3 Экспрессия, выделение и очистка

В качестве экспрессионной плазмиды использовали вектор на основе плазмиды pBR322 (4562 п.н.), содержащий ген есПА (PAC, 2541 п.н.), а также ген устойчивости к хлорамфениколу (CmR, рис.32).

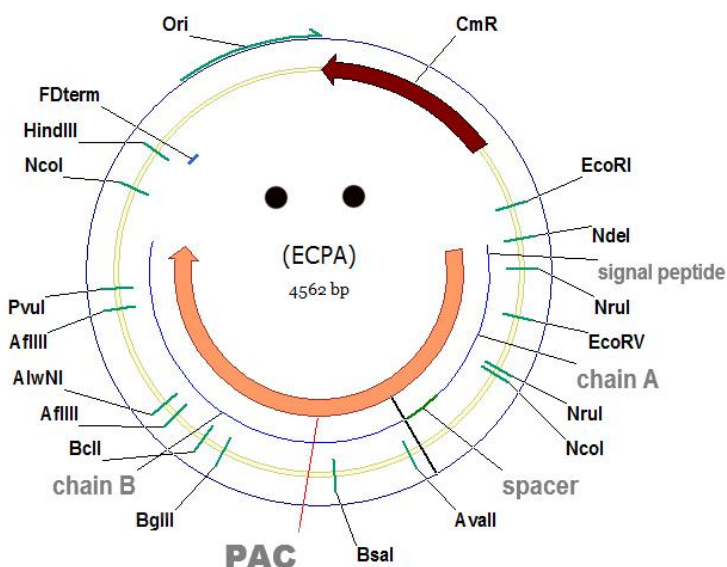


Рисунок 32. Рестрикционная карта вектора на основе pBR322.

Расстояние от последовательности Шайна-Дальгарно до AUG кодона в РАС меньше среднего, что приводит к затруднениям в системе трансляции-транспорта, заключающимся в несоответствии скоростей обоих процессов, и, как следствие, к накоплению неполноценного белка при повышенных температурах. В связи с этим экспрессию ПА следует проводить при пониженных температурах [114]. В настоящей работе экспрессию генов мутантных форм ПА осуществляли при 15°C в клетках *E.Coli* штамма TG-1 в течение 48-56 часов. Принимая во внимание рекомендации работы [111], в культуральную среду дополнительно вносили CaCl₂ в концентрации 2мМ и глицерин в концентрации 5 г/л. В качестве индуктора биосинтеза ПА использовали IPTG. В ходе культивирования констатировали прирост плотности клеточной биомассы и увеличение специфической активности по NIPAB в клеточном лизате (рис.33, здесь и далее на примере мутанта bF256R+bF71L). Культивирование прекращали при достижении высокого уровня пенициллинацилазной активности.

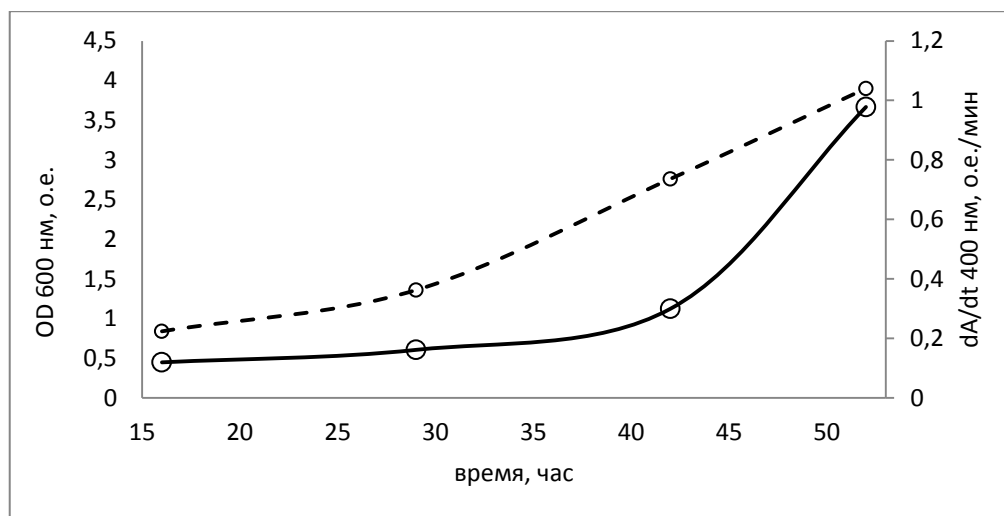


Рисунок 33. Прирост оптической плотности при 600 нм для клеток с bF256R+bF71L (прерывистая линия) и активность клеточного лизата в реакции ферментативного гидролиза NIPAB (сплошная линия).

Известно, что большинство изученных ПА транспортируется в периплазматическое пространство [115]. В связи с этим клетки, содержащие есПА, полученные на предыдущей стадии, осаждали и выделяли периплазматический экстракт методом осмотического шока в градиенте сахарозы. Выход рассматриваемого белка на этой стадии составил 24 мг/л среды. После очистки гидрофобной хроматографией на носителе Butyl-Toyopearl 650M, обессоливания и концентрирования был получен препарат с выходом 20 мг/л среды. Фактор

очистки, характеризуемый отношением специфических активностей по NIPAB в пересчете на общий белок для очищенного препарата и периплазматического экстракта, составил значение 7. Очищенные препараты полученных мутантов анализировали с помощью электрофореза в ПААГ (рис.34).

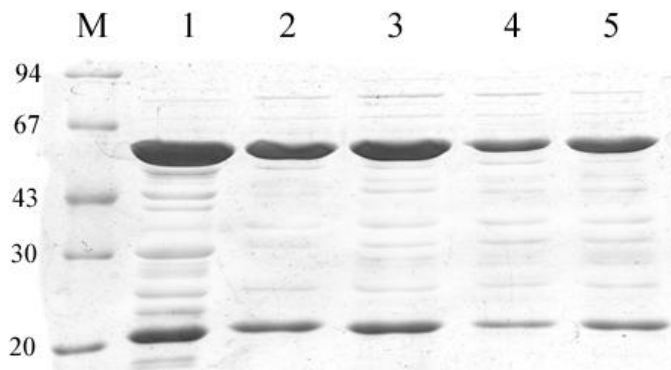


Рисунок 34. 12% SDS-ПААГ электрофорез препаратов есПА ДТ (1 дорожка - коммерческий препарат) и очищенных мутантных форм (2 – bS149R, 3 – bF256R+bF71L, 4 – bA255R+bF71L, 5 – bN388Q).

Две характерные полосы в области 23 и 63 кДа соответствуют α - и β -субъединицам белка, что свидетельствует о завершенных стадиях автокаталитического созревания.

3.4 Титрование активных центров, каталитическая активность и термостабильность

Предварительный эксперимент по титрованию активных центров показал, что инактивация полученных мутантных форм фермента под действием необратимого ингибитора сериновых протеаз - ФМСФ протекает так же эффективно как и инактивация есПА ДТ [51], и прирост остаточной активности в ходе эксперимента происходит не более, чем на 1%.

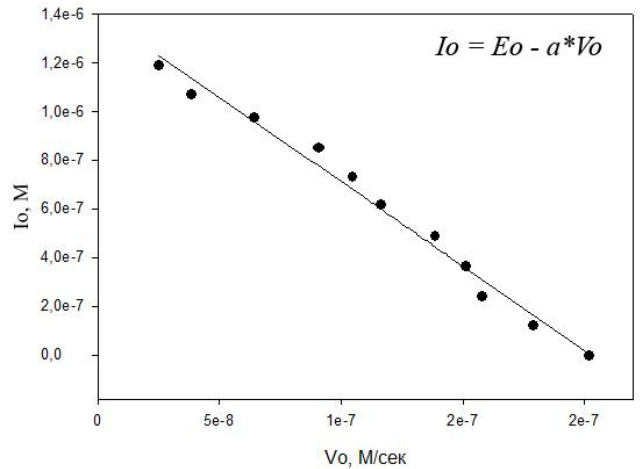
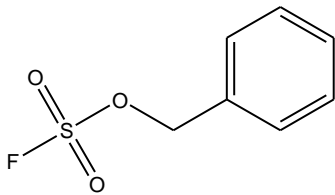
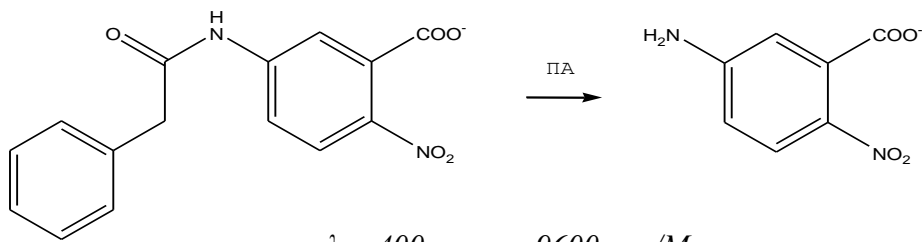


Рисунок 35. Структура ФМСФ (слева) и титрование активных центров ПА на примере β A255R+bF71L (справа).

Концентрацию активных центров ПА рассчитывали методом линейной регрессии, экстраполируя значение концентрации ингибитора до нулевого значения начальной скорости гидролиза NIPAB (рис. 35).

Кинетические параметры ферментативного гидролиза NIPAB изучали спектрофотометрически, детектируя накопление продукта гидролиза - м-карбокси-п-нитроанилина, интенсивно поглощающего при длине волны 400 нм:



$$\lambda = 400 \text{ нм}, \varepsilon = 9600 \text{ о.е./M}$$

Для определения каталитической константы k_{cat} и константы Михаэлиса K_M анализировали зависимость начальной скорости ферментативного гидролиза от концентрации NIPAB в прямых координатах (рис.36).

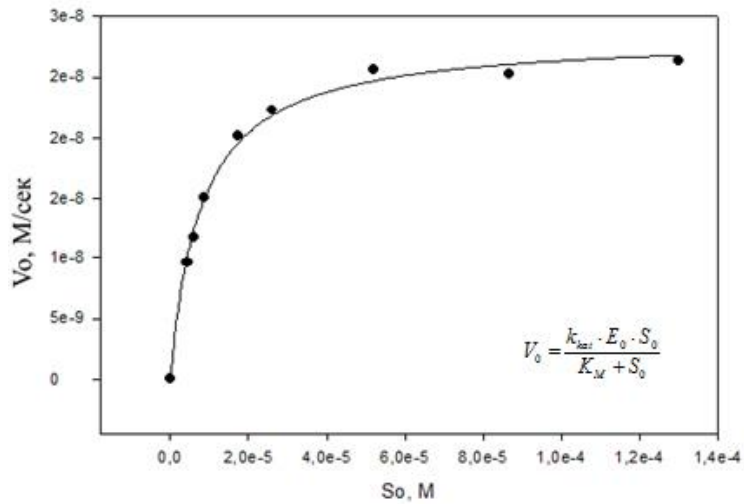
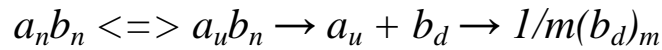


Рисунок 36. Зависимость начальной скорости (V_0) от концентрации NIPAB (S_0) на примере bN388Q+bF71L.

Согласно [116] термическая денатурация ПА представляет собой необратимый процесс, который может быть описан следующей схемой:



На первой стадии происходит обратимая потеря структуры а-субъединицы, что активирует вторую стадию – диссоциацию субъединиц и денатурацию b-цепи. Эта стадия необратима и кинетически контролируема. Третья стадия – агрегация и выпадение в осадок денатурированной b-субъединицы. Таким образом, согласно данной модели, представляющей собой детализированное представление модели Ламри-Эйринга [117], необратимая денатурация является реакцией первого порядка и может быть описана функцией: $A/A_0 = e^{-k_{in}t}$, где k_{in} – константа инактивации первого порядка (рис.37).

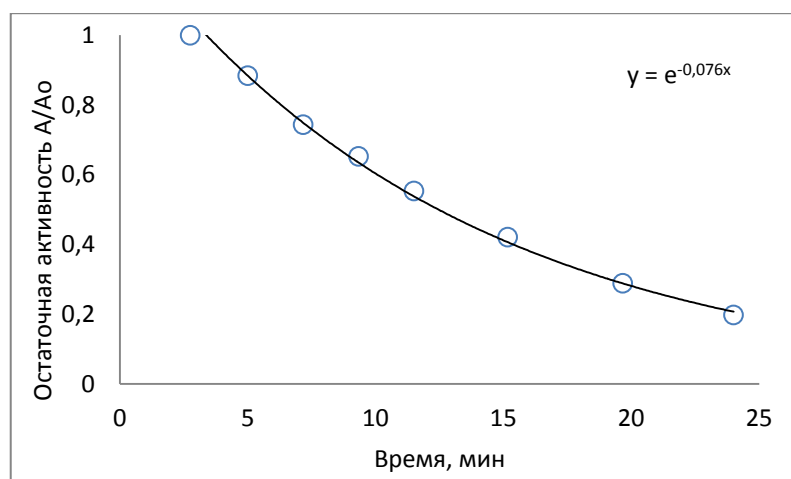


Рисунок 37. Термостабильность мутантной формы bN388Q при 50°C и pH 7,5.

Кинетические параметры гидролиза NIPAB для всех мутантов, полученных в работе, а также данные по термо- и pH-стабильности представлены в таблице 27.

Таблица 27. Кинетические параметры гидролиза NIPAB и стабильность для есПА ДТ и мутантных препаратов.

Фермент	NIPAB			Стабильность	
	k_{cat} , c^{-1}	K_M , μM	k_{cat}/K_M	термо	щелочная
есПА ДТ	28,0±0,6	23,1±0,8	1,2	-	-
bF71L	50±2	10±1	5,0	--	
aS149R	31±1	25,0±0,7	1,3	-	
bN388Q	12,9±0,6	11,2±0,6	1,2	---	
bF256R	13,7±0,4	27,0±0,8	0,5	---	
bF24A	2,7±0,2	486±19	0,006	-	
bQ292R	21,9±0,7	25±3	0,9	-	--
bR297A	29±1	22,3±0,8	1,3	---	--
bD484N	19,5±0,9	14,8±0,5	1,3	-	+++

bD484H	22,6±(0,9)	14,9±(0,5)	1,5	--	--
bI329E	27,0±0,3	20,0±0,1	1,4	--	
bS1T	н.а.	н.а.	н.а.	н.а.	
aT68S	3,3±(0,2)	10,4±(0,5)	0,3	-	
aT68S+bS1T	34,5±(1,7)	19,8±(1,0)	1,7	-	
bS1C	н.а.	н.а.	н.а.	н.а.	
bQ292R+bI329E	18,4±0,3	18±1	1,0	-	-
bW500C	29,6±0,4	20,7±0,9	1,4	--	
bM485R	н.а.	н.а.	н.а.	н.а.	
bR533C	н.а.	н.а.	н.а.	н.а.	
bR533C+bM485R	н.а.	н.а.	н.а.	н.а.	
bR533C+bW500C	20,6±0,5	18±1	1,1	-	-
bR533C+bW500C+bM485R	26,3±0,5	21±1	1,3	--	--
bA255R+bF71L	52±2	5,4±0,5	9,7	--	
bF256R+bF71L	18,4±0,9	7,2±0,6	2,6	--	
bN388Q+bF71L	40±2	7,8±0,5	5,2	---	
bF24A+bF71L	15±3	55±5	0,27	--	
bF256R+bS149R	23,7±0,7	67±2	0,4	---	
bF256R+bN388Q+bF71L	39,4±0,8	5,6±0,5	7,1	---	
bF24A+bF71L+bF256R	12±2	45±3	0,26	---	
bL220E	17,0±0,4	21±1	0,8	-	-

bF71A	21±2	9±1	1,7	--
bI177V	9,2±0,3	51±2	0,18	+
bW154F	13,7±0,5	83±3	0,16	-
aR145G+bF256R	0,60±0,01	17±1	0,04	---

Для параметра OI_{in} : +++ >5, ++ 5-2, + 2-1, - 1-0,4, -- 0,4-0,1, --- <0,1.

3.5 Эффективность синтеза

3.5.1 Определение параметров α, β, γ

Наиболее простым количественным путем изучения того, какой эффект оказывает введение мутации на способность фермента катализировать синтез антибиотика, было бы определение константы связывания нуклеофила с соответствующим ацилферментом. Однако прямое экспериментальное определение величины константы связывания нуклеофила не представляется возможным. Удобной количественной мерой, характеризующей синтетические свойства фермента в таких реакциях, является соотношение экспериментально измеренных начальных скоростей синтеза и гидролиза S/H (рис. 38).

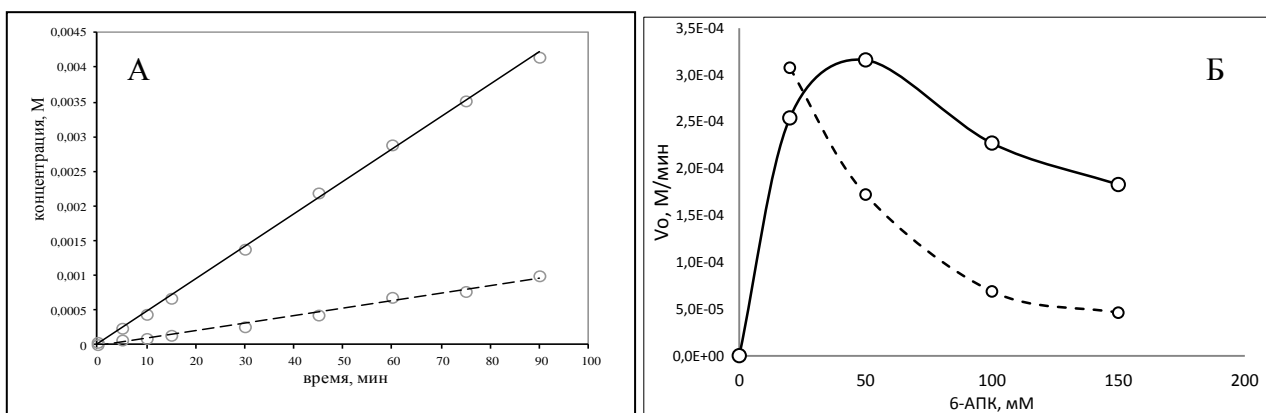


Рисунок 38. А: Накопление продукта синтеза (сплошная) и гидролиза (пунктир) для bF256R+bF71L. Условия реакции: pH 6,3, 25°C, 20 mM 6-АПК, 50 mM D-ФГ амид.

Б: Зависимость скорости накопления продукта синтеза (сплошная) и гидролиза (пунктир) для есПА ДТ от концентрации 6-АПК.

Интерполируя зависимость соотношения S/H от концентрации нуклеофила (рис. 39) модифицированной гиперболической функцией:

$$S/H = \frac{\beta \cdot [6\text{АПК}]}{1 + \beta \cdot \gamma \cdot [6\text{АПК}]},$$

нами были определены значения комплексных кинетических параметров – β и γ , которые принято считать количественной характеристикой реакционной способности нуклеофила по отношению к данному ацилферменту.

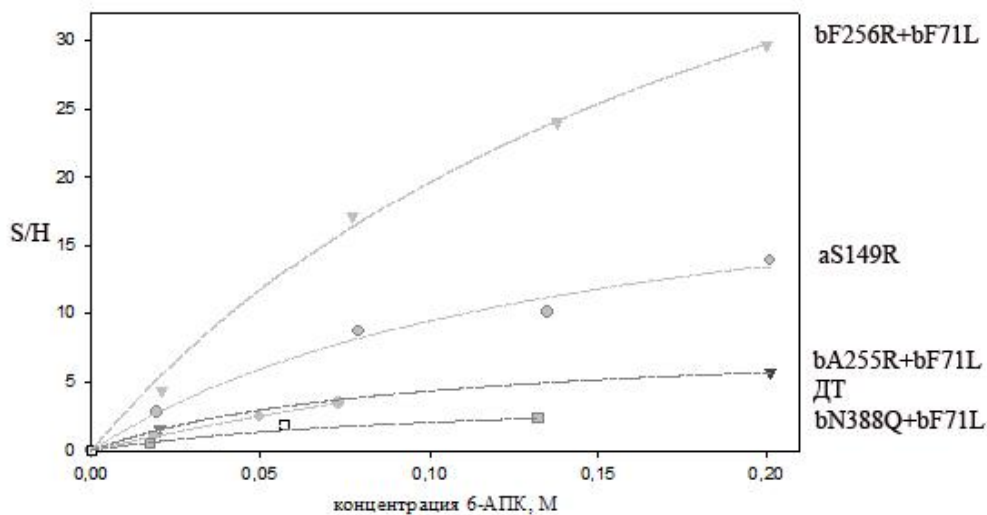


Рисунок 39. Нуклеофильная реакционная способность 6-АПК в реакции 1а для есПА ДТ и мутантов.

Для полной характеристики исследуемого процесса по отношению начальных скоростей гидролиза антибиотика и ацильного донора (рис. 40) определяли параметр α [32]:

$$\frac{(k_{cat} / K_M)_P}{(k_{cat} / K_M)_S} \equiv \alpha = \frac{k_{-4} K_S}{K_P k_2} \approx \frac{v_0^P c_0^S}{v_0^S c_0^P} = \frac{v_0^N c_0^S}{(v_0^{P2} - v_0^N) c_0^P}.$$

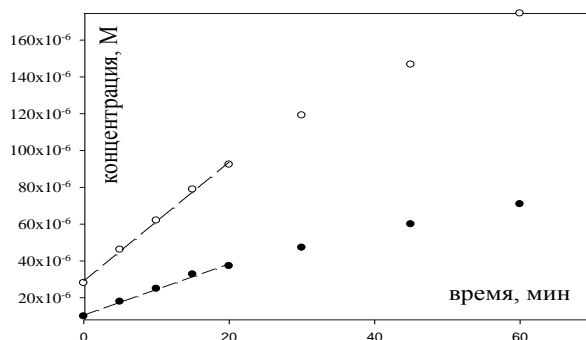


Рисунок 40. Начальные скорости накопления продуктов гидролиза ампициллина и D-ФГ амида, на примере bF256R+bF71L. Условия: 55 мМ D-ФГ амида, 2мМ ампициллина, рН 6,3, 25°C. ○ D-ФГ, ● 6-АПК.

Определенные таким образом комплексные кинетические параметры приведены в таблице 28.

Таблица 28. Комплексные кинетические параметры в реакции 1а и 2э* для есПА ДТ и мутантов.

Фермент	ОИ _{S/H}	α	β, M^{-1}	γ	%
ДТ	1,0/1,0*	13±2/15,4*	54±6/159±63*	0,05±0,01/0,2±0,1*	26/27*
bF71L	0,7	7±1	40±3	0,30±0,03	
aS149R	2,4	17±5	158±30	0,04±0,03	30
bN388Q	1,0	14±1	185±90	0,17±0,10	
bF256R	3,4	42±5	216±39	0,025±0,009	
bF24A	13,3*	0,4****	367±33*	0,07±0,01*	93*
aT68S+bS1T	1,4	15±1	61±3	0,12±0,01****	
bA255R+bF71L	1,2	12±1	91±9	0,12±0,01	
bF256R+bF71L	4,4	17±1	289±28	0,020±0,005	31

bN388Q+bF71L	0,5	4,9±0,4	39±4	0,23±0,01	
bF24A+bF71L	11,6*	0,3±0,1*	285±45*	0,16±0,03*	67*
bF256R+bS149R	3,0	33±4	169±24	0,030±0,009	
bF24A+bF256R+bF71L	>17*	7,9±1,4*	356±71*	0,016±0,01*	78*
aR145G+bF256R	5,6	240±28	1340±120	0,008±0,002	

% - максимальный выход антибиотика при эквимольных (50мМ) условиях,

** - данные [92], ***-см. 3.8.1.

С целью изучения максимального выхода целевого антибиотика в условиях влияния всех трех комплексных кинетических параметров нами были построены интегральные кинетические кривые накопления для есПА ДТ и мутантов aS149R, bF256R, bF24A, bF256R+bF71L, bF24A+bF71L, bF24A+bF71L+bF256R, показавших хорошие эффекты по отдельным параметрам (рис. 41).

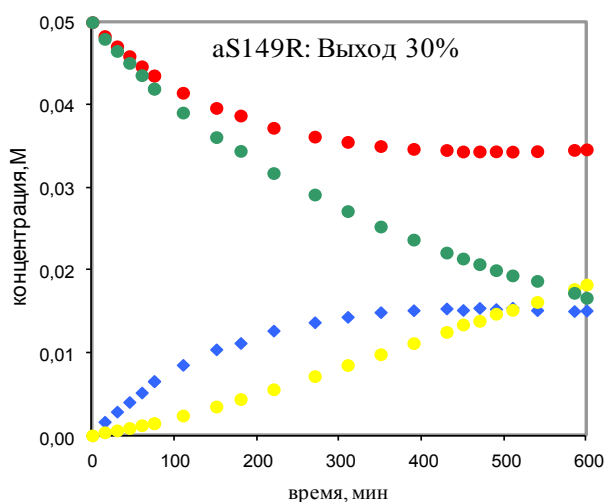


Рисунок 41. Интегральная кинетика реакции 1a для мутанта aS149R. Условия проведения синтеза: 50 мМ 6-АПК, 50 мМ D-ФГ амида, pH 6,3, 25°C. ● – 6-АПК, ● – D-ФГ амид, ● – Ампициллин, ● – ФГ.

3.5.2 Уточнение к вычислению параметра α .

Как было указано в предыдущем разделе, параметр α можно экспериментально определять при совместном гидролизе двух субстратов по начальным скоростям накопления нуклеофила V_0^N и ацильной части V_0^{P2} . Однако же функция $V^N(t)$ представляет собой отражение сложнейшего процесса, в результате которого нуклеофил как накапливается (EAN→EA, EAN→E), так и расходуется (EA→EAN). Моделирование процесса при численном решении системы дифференциальных уравнений (см. приложение 3) показало, что кривая накопления нуклеофила проходит как минимум через 3 перегиба (рис.42). При этом диапазон линейности начального участка, где соблюдается условие $\alpha_{\text{эксп}} \equiv \frac{V_0^N c_0^S}{(V_0^{P2} - V_0^N) c_0^P} \geq 0,95\alpha$ оказывается очень мал и определяется начальными концентрациями реагентов (табл.29)

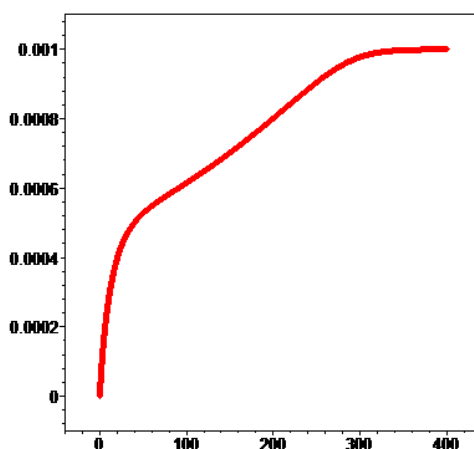


Рисунок 42. Накопление нуклеофила при совместном гидролизе продукта (0,001 М) и ацильного донора (0,01 М). По оси ординат концентрация нуклеофила (М), по оси абсцисс время (с). Параметры модели $\alpha = 10$, $\beta = 1000$, $\gamma = 0,01$.

Таблица 29. Максимальная степень конверсии продукта, при которой достоверно (95%) определяется значение параметра $\alpha_{\text{эксп}}$, для различных начальных концентраций исходных реагентов при совместном гидролизе.

S_0, M	P_0, M	% конверсии по P
10	1	0,000047%
1	0,1	0,047%
0,1	0,01	0,47%
0,01	0,001	3,2%
0,001	0,0001	8,3%
0,0001	0,00001	9,8%

Параметры модели $\alpha = 10$, $\beta = 1000$, $\gamma = 0,01$.

Как видно из таблицы 29, чем ниже концентрация реагентов, тем для более высокой степени конверсии можно проводить определение начальных скоростей. При установлении зависимости экспериментально определяемого значения параметра $\alpha_{\text{эксп}}$ от концентрации (сознавая при этом, что сам параметр α от концентрации не зависит) была получена кривая (рис. 43), которая иллюстрирует нелинейное уменьшение параметра $\alpha_{\text{эксп}}$ при увеличении концентрации. Также нами было показано, что значение параметра $\alpha_{\text{эксп}}$ сильно зависит от присутствия в системе солей. Так, например, включение в систему 10мМ ФБ более чем в 2 раза сказывается на увеличении параметра $\alpha_{\text{эксп}}$.

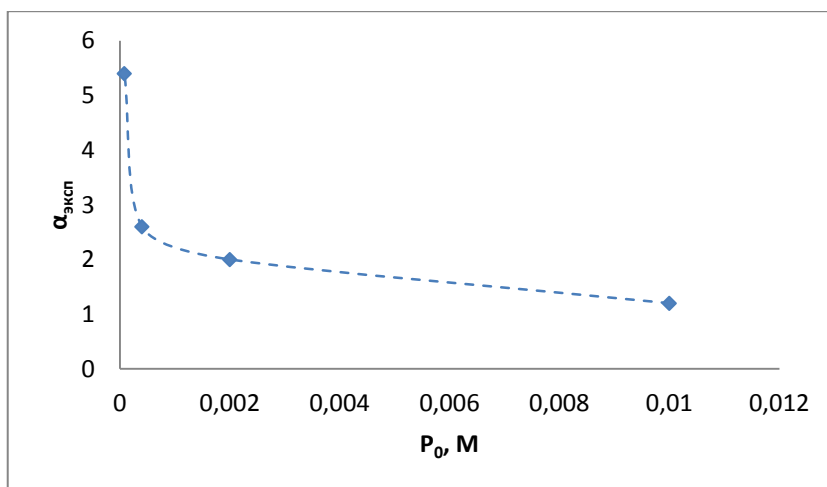


Рисунок 43. Влияние концентрации продукта (P_0 , ампициллин) на $\alpha_{\text{эксп}}$ для есПА ДТ при совместном гидролизе. Концентрация ацильного донора в каждой точке $S_0=10P_0$.

Ориентиром для нахождения истинного значения параметра α служит величина, найденная для раздельного гидролиза, при обработке зависимости начальной скорости гидролиза (V_0/E_0) от концентрации субстрата (S_0) в условиях $S_0 \ll K_M$. (рис. 44), которая для фермента есПА ДТ составляет значение $\alpha=11 \pm 2$.

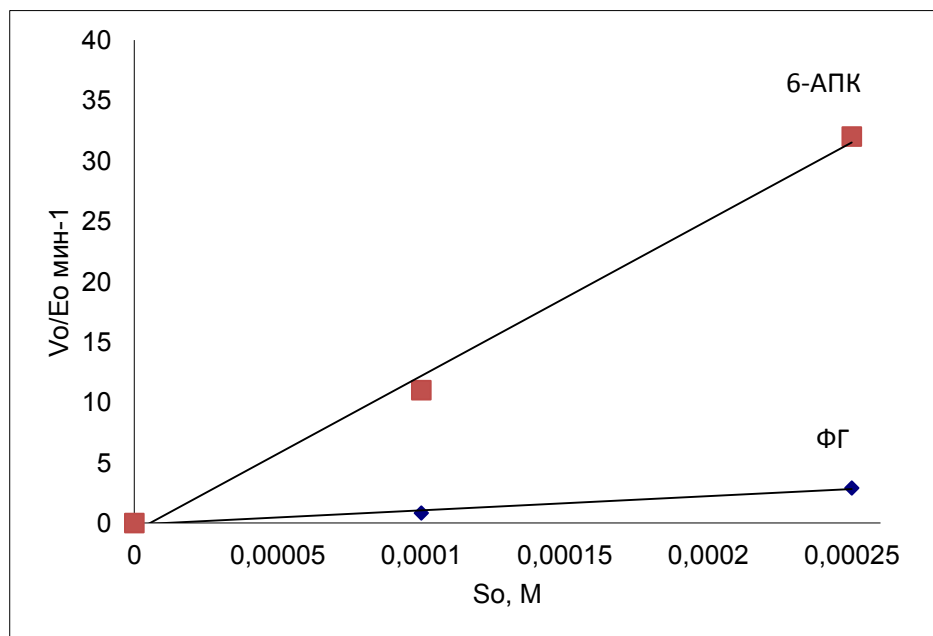


Рисунок 44. Зависимость скорости реакции гидролиза ампициллина и ФГА от концентрации субстрата для есПА ДТ.

Величина $\alpha_{\text{эксп}} = 13 \pm 2$ (таблица 28) для еПА ДТ случайным образом совпадает с истинным значением α в силу того, что эксперимент проводили в присутствии 10мМ ФБ, который приводит к существенному завышению параметра. Поэтому данные $\alpha_{\text{эксп}}$ из таблицы 28 не могут рассматриваться как близкие к истинным значениям α , однако могут послужить иллюстрацией для качественного сравнения мутантных форм.

Таким образом, методика совместного гидролиза для определения истинного значения параметра α требует существенной доработки, однако, при проведении реакции в идентичных условиях может служить для быстрой качественной оценки эффекта от мутации.

3.6 Стереоселективность

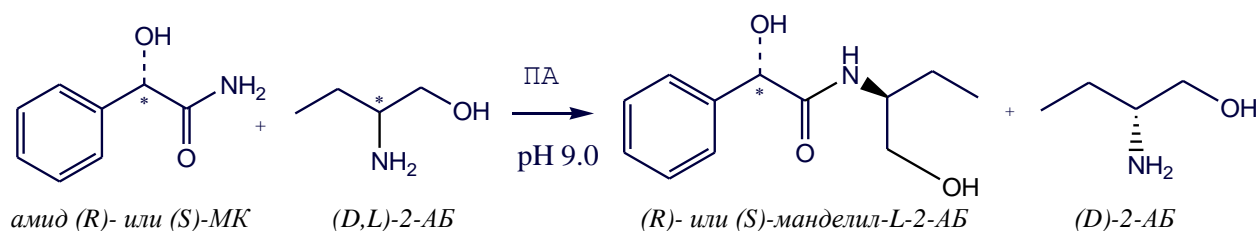
Мутации в активном центре есПА, изначально направленные на улучшение каталитических свойств фермента в отношении одних субстратов, могут повлиять на специфичность, а также стереоспецифичность фермента в отношении других субстратов. Сам по себе дизайн мутантов, с целью одновременного улучшения связывания (K_M) одного энантиомера и ухудшения или неизменности связывания другого, представляет собой довольно не тривиальную задачу. Еще сложнее предсказывать изменение каталитической константы (k_{cat}). Поэтому эмпирический скрининг библиотеки мутантов представляется пока наиболее доступным подходом к инженерии стереоспецифичности фермента в отношении к конкретным соединениям.

Известно, что стереоселективность есПА в реакциях ацилирования аминокислот и гидролиза их N-ацильных производных достаточно высока, что с успехом может использоваться при получении их в энантиомерно чистой форме. Однако для аминоспиртов значение стереоселективности на порядки ниже и улучшение этого параметра для данного класса соединений представляет большой практический интерес [48].

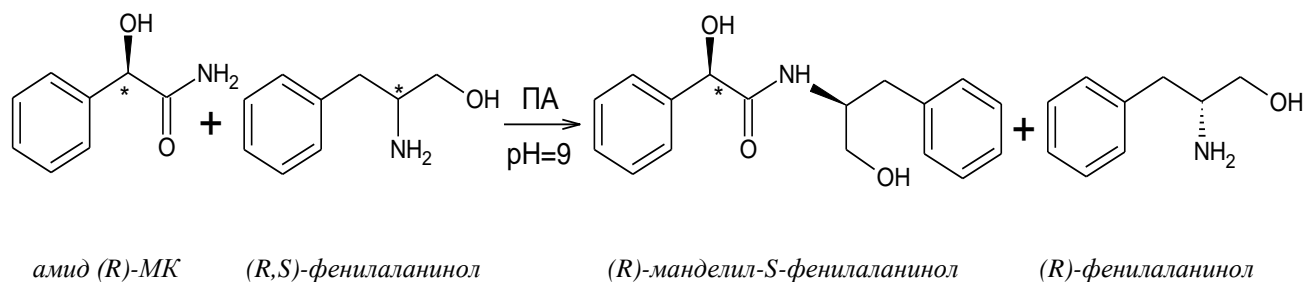
В рамках данной работы нами была изучена стереоселективность мутантов ПА в реакциях ацилирования алифатического 2-аминобутанола (2-АБ) и ароматического фенилаланинола (ФА), а также гидролиза N-фенилацетильного производного фенилаланинола (ФФА). На практике 2-АБ используется как промежуточное соединение в синтезе противотуберкулезного препарата Этамбутола [118], а также может выполнять роль хирального агента для разделения рацематов, например, при получении оптически чистого предшественника гипотензивного препарата Каптоприла [119]. Различные производные

энантимеров ФА могут применяться при лечении центральной нервной системы [120], специфических воспалений [121] и также выполнять роль хиральных агентов [122].

Реакцию ацилирования (L,D)-2-АБ проводили с двумя донорами ацильной части – амидами (R)- и (S)-МК:



Реакцию ацилирования (L,D)-ФА проводили с амидом (R)-МК:



Стереоселективность определяли как отношение начальных скоростей синтеза N-манделил-производных, соответствующих (L)- и (D)-формам (рис. 45).

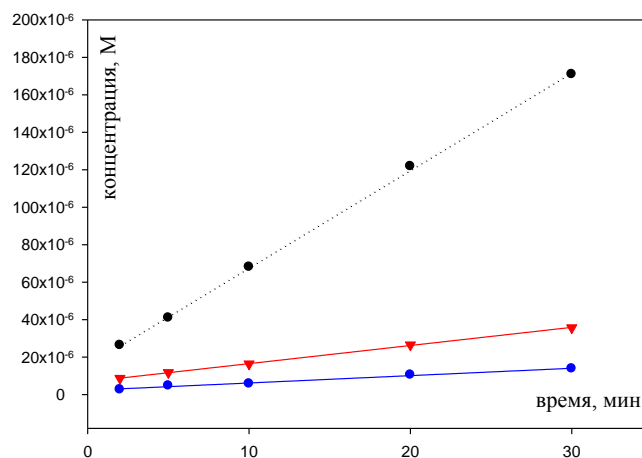
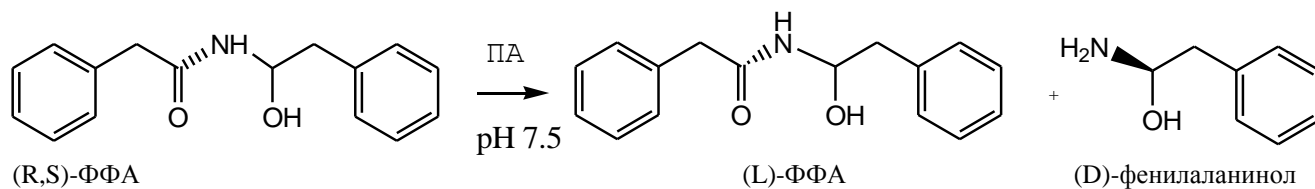


Рисунок 45. Ацилирование рацемата 2-АБ амидом R-МК на примере мутанта bF256R+bF71L ● – МК, ▲ – N-манделил-(L)-2-АБ, ● – N-манделил-(D)-2-АБ.

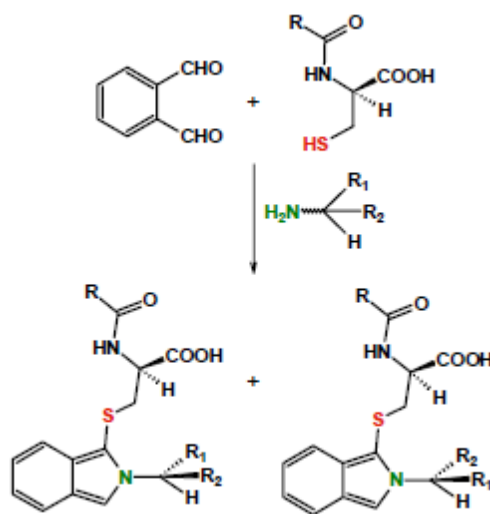
Также по отношению суммарных начальных скоростей синтеза N-манделил-производных и гидролиза ацильного донора с образованием МК определяли значения параметра S/H.

Стереоселективность в реакции гидролиза ФФА определяли по отношению начальных скоростей накопления (D)- и (L)-фенилаланинола:



Концентрацию образующихся при гидролизе свободных аминогрупп определяли после предварительной модификации реакционной смеси хиральным тиолом – N-манделил-(S)-цистеином и о-фталевым альдегидом (схема 5), как это описано в [123].

Схема 5. Модификация первичных аминогрупп о-фталевым альдегидом и хиральным тиолом.



Полученные результаты представлены в таблицах 30-33:

Таблица 30. Стереоселективность, каталитическая активность и эффективность ацильного переноса есПА ДТ и мутантов в реакции ацилирования 2-АБ амидом R-МК или эфиром D-ФГ.

Фермент	2-АБ +R-МК амид (D-ФГ эфир*)			
	$V_0/E_0, c^{-1}$	S/H	E_S	э.и.50%
ДТ	0,4/0,7*	0,02/0,02*	12±1/3,7±0,6*	84%/57%*
bS1T+bT68S	0,7	0,02	10±1	82%
bT68S	0,01	0,05	3,0±0,2	49%
bF24A	0,8*	0,02*	20±1*	90%*
bF24A+bF71L	13,8*	0,2*	6,1±0,4*	72%*
bF24A+bF71L+bF256R	3,4*	0,1*	3,2±0,3*	52%*
bF71L	1,9	0,3	54±15	96%
bF71A	0,4	0,1	80±17	98%
aS149R	0,2	0,03	8±1	77%
bN388Q	0,6	0,03	19±4	90%
bN388Q+bF71L	3,1	0,28	37±7	95%
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%

Таблица 31. Стереоселективность, каталитическая активность и эффективность ацильного переноса еПА ДТ и мутантов в реакции ацилирования 2-АБ амидом S-МК.

Фермент	2-АБ +S-МК амид			
	$V_0/E_0, c^{-1}$	S/H	E_S	э.и.50%
ДТ	0,3	0,05	2,3±0,1	39%
bF71L	0,1	0,16	1,7±0,2(R)	26%
aS149R	0,1	0,03	5,1±0,5	67%
bN388Q+bF71L	0,05	0,5	1,6±0,1(R)	23%
bF256R	0,04	0,06	1,6±0,2	23%
bF256R+bF71L	0,02	1,2	1,3±0,2(R)	13%

Таблица 32. Стереоселективность, каталитическая активность и эффективность ацильного переноса еПА ДТ и мутантов в реакции ацилирования ФА амидом R-МК или эфиром D-ФГ.

Фермент	ФА +R-МК амид (D-ФГ эфир*)			
	$V_0/E_0, c^{-1}$	S/H	E_S	э.и.50%
ДТ	1,0/2,2*	0,1/0,2*	2,8±0,1/1,2±0,1*	47%/9%*
bS1T+bT68S	1,2	0,1	3,1±0,2	51%
bT68S	0,01	0,05	3,0±0,2	49%
bF24A	5,8*	0,15*	4,6±0,4*	64%*
bF24A+bF71L	34,2*	0,47*	6,0±0,1(R)*	71%*
bF24A+bF71L+bF256R	2*	0,08*	1,8±0,1(R)*	29%*

bF71L	4,34	1	27±1	93%
bF71A*	1,4	1	700±300	99,7%
aS149R	0,3	0,1	2,6±0,4	44%
bN388Q	0,3	0,1	2,7±0,2	46%
bN388Q+bF71L	3,8	0,85	48±4	96%
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%

Таблица 33. Стереоселективность и каталитическая активность есПА ДТ и мутантов в реакции гидролиза ФФА.

Фермент	ФФА		
	$V_0/E_0, c^{-1}$	E_S	э.и.50%
ДТ	0,8	3,5±0,5	55%
aS149R	0,25	2,9±0,3	48%
bN388Q+bF71L	0,1	18,5±0,5(R)	90%

Следует отметить, что оптическая чистота коммерческого препарата (R)-2-АБ варьирует от 95% до 97% в зависимости от производителя. Так, компания «Sigma-Aldrich» выпускает препарат с э.и. 96% (CAS №5856-63-3). Отдельные энантиомеры ФА тот же производитель предлагает с э.и.>99%. Таким образом, для получения аналогов коммерческого оптически чистого 2-АБ теоретически могут быть использованы мутантные формы ПА bF71A, bF71L, bN388Q+bF71L, bF256R+bF71L, bA255R+bF71L, bF256R+bN388Q+bF71L, а для получения аналогов ФА форма bF71A.

3.7 Анализ экспериментальных данных

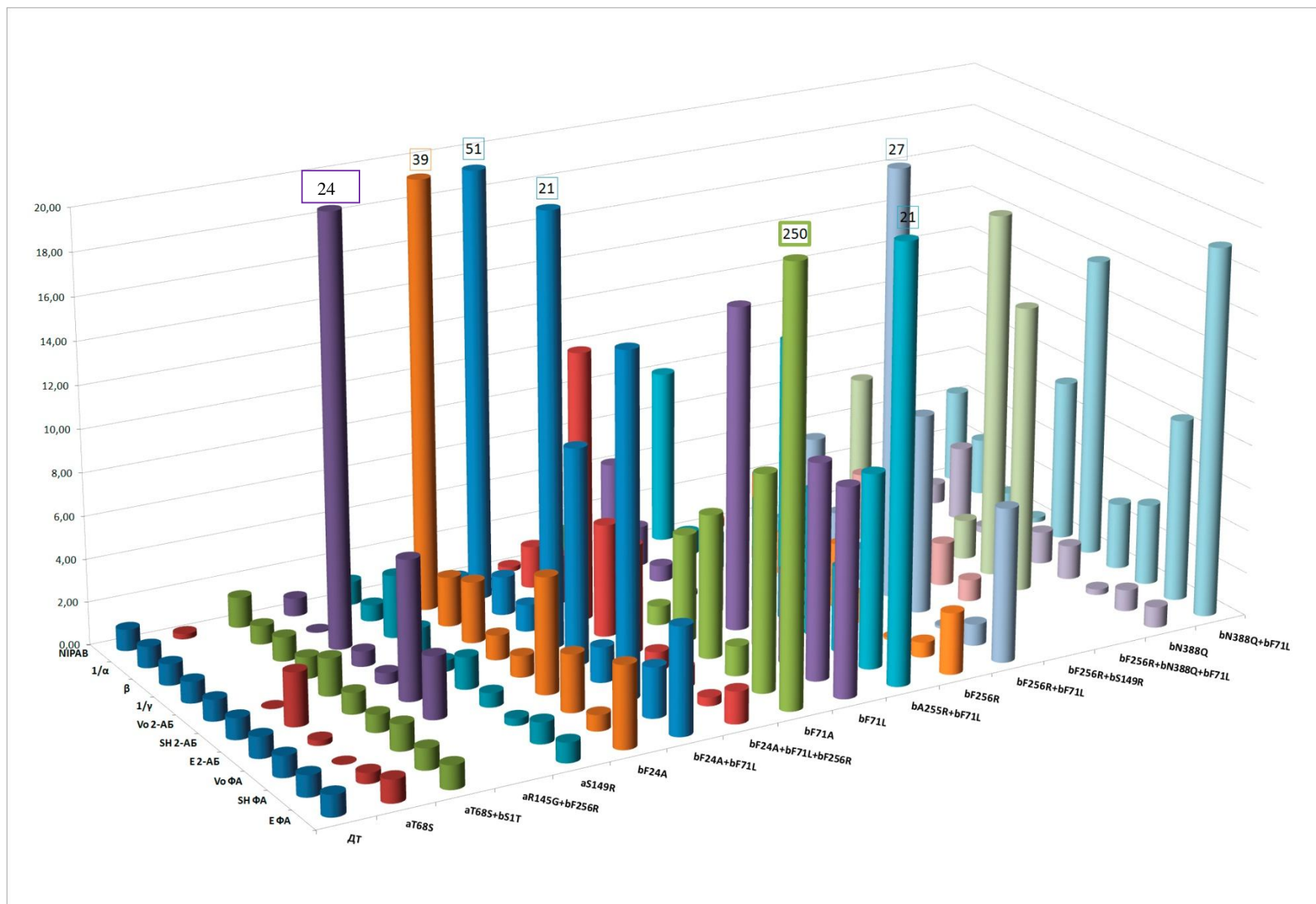
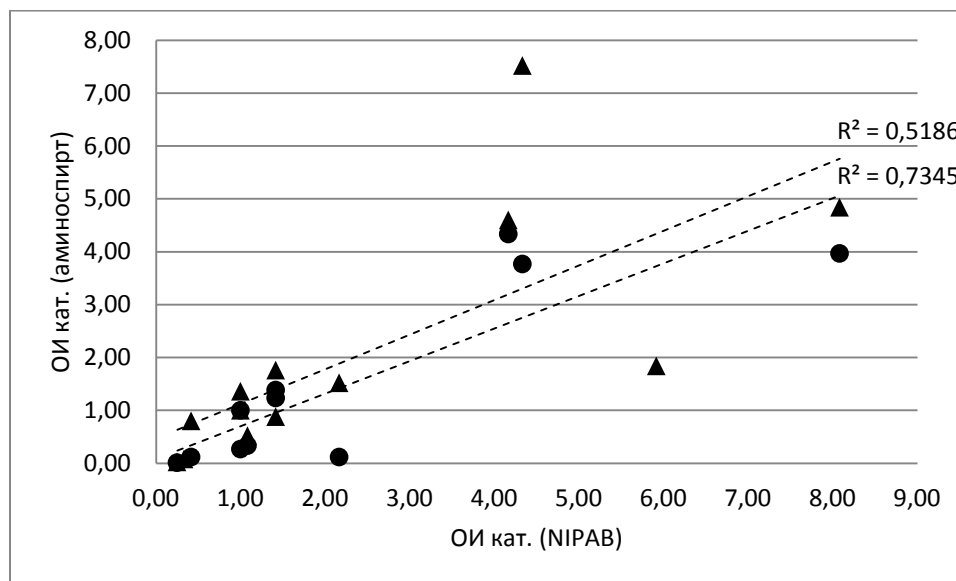


Диаграмма 2. Сводная диаграмма мутантов есПА с измененными каталитическими свойствами.

На диаграмме 2 отражены относительные изменения (ось ординат) различных каталитических свойств (левая ось абсцисс) мутантных форм есПА (правая ось абсцисс) по сравнению с есПА ДТ. Для наглядности картины ось ординат ограничена 20-кратным увеличением свойств, при этом значения больших эффектов приведены сверху столбцов. По левой оси абсцисс по порядку приведены следующие параметры: NIPAB – k_{cat}/K_M в реакции гидролиза NIPAB; $1/\alpha$, β , $1/\gamma$ – эффективные кинетические параметры в реакции синтеза ампициллина или амоксициллина; V_0 , S/N , E – каталитическая активность, S/N и стереоселективность в реакциях синтеза 2-АБ и ФА. Мутации, по которым не проводилось изучение каталитических свойств в реакциях синтеза на диаграмме не представлены.

Среди всего набора экспериментальных данных представляется возможным установить три типа возможных корреляций, согласуясь с соответствием размерностей сопоставляемых данных и их логической взаимосвязи. Первый возможный тип корреляции – взаимоотношение каталитической активности в реакции гидролиза NIPAB с каталитической активностью в реакции ацилирования аминоспиртов. Если сравнивать относительные изменения данных параметров, то возможно установить следующий вид корреляции (рис. 46):



Риунок 46. Корреляции между относительным изменением каталитической активности (k_{cat}/K_M) в реакции гидролиза NIPAB и V_0/E_0 в реакции ацилирования аминоспиртов (▲-2-АБ ● - ФА) для мутантных форм есПА. Исключены формы, содержащие мутацию bF24A.

Как видно из рисунка 45, для обоих аминоспиртов устанавливается прямая зависимость скорости реакции ацилирования от каталитической активности в реакции гидролиза цветного субстрата. Что особенно интересно, угол наклона в обоих случаях получился одинаковым, что может свидетельствовать о независимости относительного изменения скорости реакции от природы аминоспирта. Однако для подтверждения этой гипотезы необходимо провести ряд уточняющих экспериментов как с различными нуклеофилами, так и с большим числом мутантов (для увеличения выборки). Интересен также факт, что тангенс угла наклона составляет величину меньше 1 (приблизительно 0,6), что говорит о большей чувствительности каталитической активности в реакции гидролиза NIPAB к вводимой мутации по сравнению с реакцией синтеза.

Второй возможный тип корреляции – взаимоотношение синтетических способностей фермента (S/H или β) в реакциях с 6-АПК (синтез ампициллина) и аминоспиртами. Если сравнивать относительные изменения данных параметров, то на лицо отсутствие каких-либо закономерностей (рис. 47):

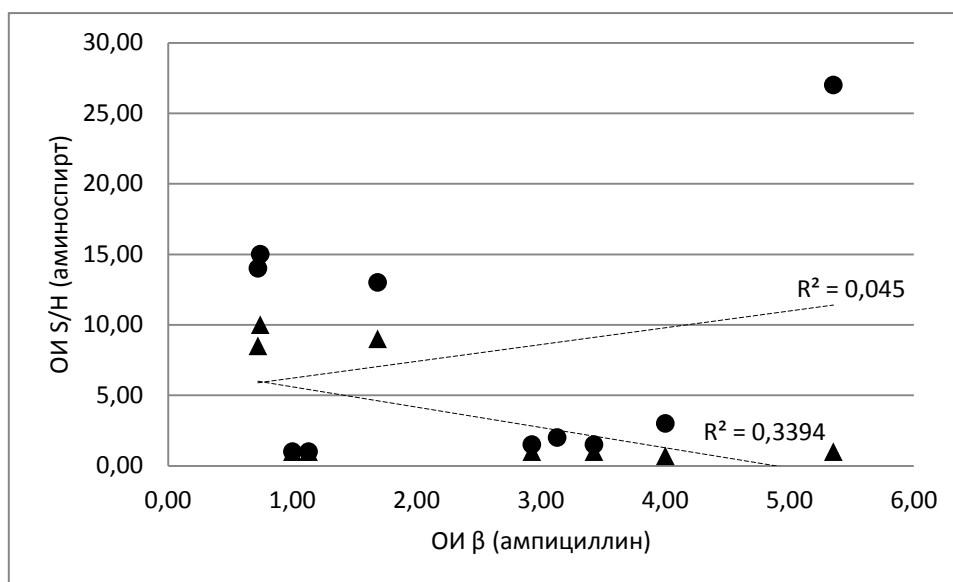


Рисунок 47. Корреляции между относительным изменением параметра β в реакции синтеза ампициллина и S/H в реакции ацилирования аминоспиртов (▲-2-АБ ● - ΦА) для мутантных форм есПА. Исключены формы, содержащие мутацию bF24A.

Отсутствие корреляций можно объяснить разной природой нуклеофила и в первую очередь наличием в структуре 6-АПК заряженной карбоксильной группы, что оказывает

очевидное воздействие на синтетические параметры. В таком случае корреляции должны быть найдены для нуклеофилов схожей природы. Действительно, оказывается что S/H внутри группы аминспиртов меняется синхронно (рис. 48).

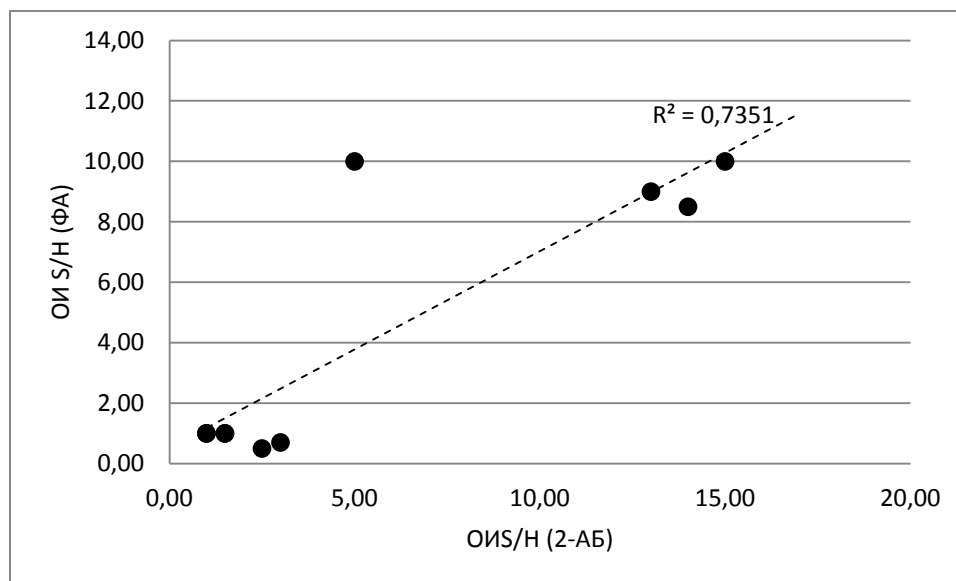


Рисунок 48. Корреляции между относительным изменением параметров S/H в реакции ацилирования 2-АБ и ФА для мутантных форм есПА. Исключены формы, содержащие мутацию bF24A, а также bF256R+bF71L.

Третий возможный тип корреляций – соотношение α и β в реакции синтеза ампициллина и амоксициллина, вытекает из логической взаимосвязи параметров. Нами было замечено, что мутации, приводящие к увеличению параметра β негативно сказываются на параметре α , который также увеличивается, что, предположительно, может являться следствием улучшения связывания бета-лактамной части обоих субстратов (K_N для б-АПК в случае β и K_P для ампициллина/амоксициллина в случае α). При построении зависимости (рис. 49) действительно была обнаружена относительно слабая корреляция для реакции 1a ($R^2=0,3$), что может свидетельствовать о частичной зависимости параметров, возможно, из-за большой схожести участков связывания нуклеофила и антибиотика. Для реакции 2э корреляция отсутствует, судя по всему, по причине того, что в выборку попали мутации, приводящие к изменению параметров по разным механизмам. Так, например, мутация bF24A направлена на подавление амидазной активности, а также на улучшение связывания ацильной части субстрата, а мутации bF256R и bF71L направлены на изменение связывания амидной части субстрата.

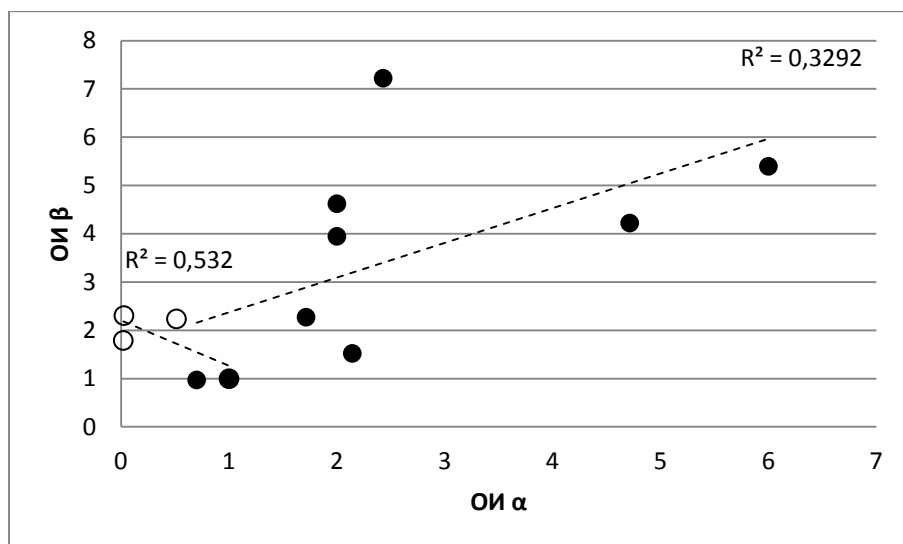


Рисунок 49. Корреляции между относительными изменениями параметров β и α в реакции синтеза ампициллина (●) и амоксициллина (○) для мутантных форм еСПА. Исключена форма bF256R+aR145G.

На первый взгляд может показаться очевидной возможность установления корреляций между стереоселективностью внутри группы аминспиртов, однако, данный параметр отражает гораздо более тонкое свойство, чем S/N и тем более V_0 , и может оказаться гораздо более чувствителен к мутации. Данную ситуацию иллюстрирует пример с мутантом bF71A (рис. 50).

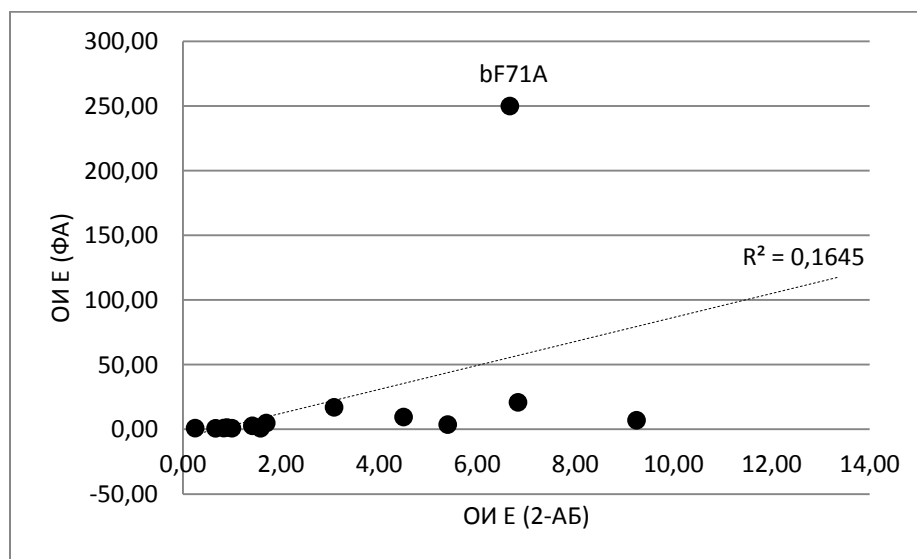


Рисунок 50. Корреляции между относительным изменением параметра стереоселективности (E) в реакции ацилирования 2-АБ и ФА для мутантных форм еСПА.

3.8 Мутагенез для изменения каталитической активности

3.8.1 Мутации *bS1T*, *bS1C*, *bT68S*, *bS1T+bT68S*

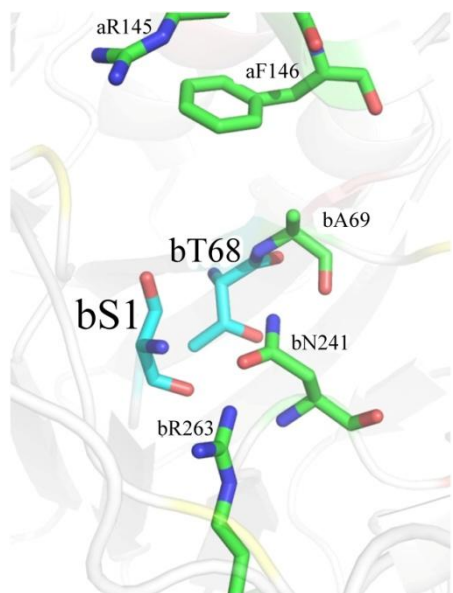


Рисунок 51. Остатки bS1 и bT68 в активном центре есПА.

Остаток bS1 - основной каталитический элемент ПА, определяющий принадлежность фермента к классу Ntn-гидролаз, в которых нуклеофильным донором является N-концевой серин, цистеин или треонин. Так, остаток серина на N-конце характерен для всех известных ПА. Остаток треонина встречается у протеасом и аспартилглюкозаминидаз. Остаток цистеина можно обнаружить у глутамин амидотрансфераз [124]. Известно, что для активных центров ферментов весьма характерно изоморфное замещение каталитических групп на родственные по структуре. Так, серин иногда может быть замещен на треонин без существенного изменения в механизме катализа [125]. В литературе есть примеры, где замена нуклеофильного серина на треонин приводила к повышению активности фермента [126].

Авторы работы [127] проводили замену N-концевого bS1 в есПА на T, R, G и C. Ни в одном из случаев фермент не удалось получить в активной форме. В случае замены S на T, R, G белок накапливался исключительно в виде предшественника, и только в случае замены S на C получался зрелый неактивный фермент. Неспособность мутантов к автопротеолизу в случае замены S на T может являться следствием несоответствия размеров остатков и снижением доступности активного центра.

С целью решения этой проблемы нами было предложено компенсировать возможное стерическое затруднение аналогичной «обратной» заменой соседнего остатка bT68 на S в мутанте *bS1T+bT68S*. По данным биоинформатического анализа суперсемейства Ntn гидролаз позиции b1 и b68 являются коррелирующими и меняются синхронно при переходе от одной подгруппы к другой. Подобная комбинация встречается в семействе протеасом. Остаток bT68 находится в непосредственной близости с остатком bS1 (рис. 51) на расстоянии 3.8Å (между Cβ атомами). Двойная замена не приводит к общему увеличению числа атомов в

столь значимом для катализа регионе и, действительно, удается получить зрелый и активный белок.

При изучении кинетики реакции гидролиза NIPAB было обнаружено 1,5-кратное улучшение каталитической активности для мутанта bS1T+bT68S, в равной степени за счет улучшения k_{cat} и K_M (табл. 34). При этом отдельно мутант bS1T, также как и bS1C, не обладал активностью, что согласуется с результатами [127]. Одиночный мутант bT68S в 8 раз теряет в k_{cat} и более чем на один порядок в термостабильности, что также свидетельствует о взаимном дополнении мутаций bT68S и bS1T. Также важно отметить отсутствие дестабилизации для bS1T+bT68S, по сравнению с есПА ДТ. Тот факт, что для мутанта bT68S наблюдается более чем 2-кратное уменьшение K_M не обязательно означает улучшение связывания, а может быть вызвано сильным падением k_{cat} ($K_M = (k_{off}+k_{cat})/k_{on}$).

Таблица 34. Кинетические параметры гидролиза NIPAB и стабильность для есПА ДТ и мутантов на основе bS1X и bT68S.

Фермент	NIPAB			pH 7; 50°C
	k_{cat} , с ⁻¹	K_M , μM	k_{cat}/K_M	k_{in} , мин ⁻¹
ДТ	28,0±0,6	23,1±0,8	1,2	7,2±0,1·10 ⁻⁴
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 ^{-2*}
bS1T+bT68S	34,5±(1,7)	19,8±(1,0)	1,7	9±1·10 ⁻⁴
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.

При изучении реакции 1a для мутанта bS1T+bT68S было обнаружено увеличение параметра S/N в 1,4 раза, а также незначительное увеличение каталитической активности, при отсутствии заметных изменений в эффективных кинетических параметрах (табл.35).

Таблица 35. Кинетические параметры в реакции 1а для есПА ДТ и bS1T+bT68S.

Фермент	$V_0/E_0, c^{-1}$ *	S/H^*	α	β, M^{-1}	γ
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. * для условий $S_0=N_0=50mM$.

В реакции ацилирования аминок спиртов амидом R-МК для двойного мутанта bS1T+bT68S наблюдали почти 2-кратное увеличение каталитической активности для 2-АБ и менее значительное для ФА при сохранении эффективности синтеза и стереоспецифичности. Для одиночного мутанта bT68S наблюдали значительное ухудшение каталитических параметров (табл. 36-37).

Таблица 36. Стереоселективность, каталитическая активность и эффективность ацильного переноса есПА ДТ и мутантов bS1T+bT68S и bT68S в реакции ацилирования 2-АБ амидом R-МК.

Фермент	2-АБ + R-МК амид			
	$V_0/E_0, c^{-1}$	S/H	E_s	э.и. ^{50%}
ДТ	0,4	0,02	12±1	84%
bS1T+bT68S	0,7	0,02	10±1	82%
bT68S	0,01	0,05	3,0±0,2	49%

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

Таблица 37. Стереоселективность, каталитическая активность и эффективность ацильного переноса есПА ДТ и bS1T+bT68S в реакции ацилирования ФА амидом R-МК.

Фермент	ФА + R-МК амид			
	$V_0/E_0, c^{-1}$	S/H	Es	э.и. ^{50%}
ДТ	1	0,1	2,8±0,1	47%
bS1T+bT68S	1,2	0,1	3,1±0,2	51%

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

Таким образом, комбинация мутаций bS1T+bT68S приводит к зрелому ферменту и может рассматриваться как дополнительный фактор улучшения каталитической активности и S/H при конструировании многоточечных мутантов.

3.8.2 Мутации *bI177V*, *bW154F*

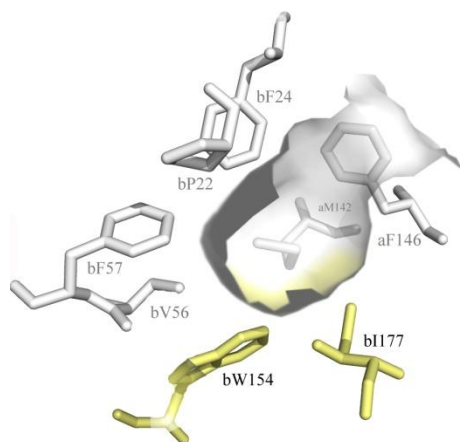


Рисунок 52. Остатки гидрофобного кармана есПА.

Для использования ПА в реакциях получения полусинтетических бета-лактамных антибиотиков желательна высокая специфичность фермента к соответствующим производным ФУК. В работах [92; 93] были получены мутации по остаткам bF24 и aF146, улучшающие связывание для C α -производных ФУК. Для расширения субстратной специфичности есПА в данной работе было предложено расширить (углубить) гидрофобный карман за счет мутаций bI177V и bW154F, сохраняющих природу остатка, но занимающих меньший объем (рис.52).

По данным биоинформатического анализа (см. приложение 4) остатки bI177 и bW154 являются консервативными во всем семействе ПА. В позиции b177 в п/гр 1-3 встречается исключительно I, а в п/гр 4 (bmПА) - изомер L. Для АГЛА характерен меньший по размеру V, в то время как в группе ГА - это ароматический F. В позиции b154, аналогично, в п/гр 1-3 встречается исключительно W, а в п/гр 4 - Y. Такое же распределение (W и Y) сохраняется для АГЛА и ГА. Таким образом, указанные мутации можно обнаружить в природе в тех или иных ферментах, что гипотетически повышает вероятность получить мутантные препараты в активной форме.

Действительно, нами были получены активные препараты есПА bI177V и bW154F. Как и следовало ожидать, при изучении кинетики гидролиза NIPAB, ацильная часть которого представлена ФУК, обнаружилось ухудшение связывания и катализа, что привело к уменьшению константы специфичности практически на порядок (табл. 38).

Таблица 38. Кинетические параметры гидролиза NIPAB для есПА ДТ и ее мутантов.

Фермент	NIPAB			pH 7,5; 50°C*
	k_{cat} , с ⁻¹	K_M , μМ	k_{cat}/K_M	k_{in} , мин ⁻¹
ДТ	28,0±0,6	23,1±0,8	1,2	$3,7±0,2 \cdot 10^{-3}$
bI177V**	9,2±0,3	51±2	0,18	$2,2±(0,2) \cdot 10^{-3}$
bW154F**	13,7±0,5	83±3	0,16	$6,2±(0,3) \cdot 10^{-3}$

* 0,1М КСl,

** Использовали периплазматический экстракт.

Для изучения эффекта мутации на связывание производных ФУК в гидрофобном кармане проводили ингибиторный анализ для таких субстратов как п-ОН-ФУК, ФОУК, п-СН₃-ФГ, п-ОН-ФГ. Для обоих мутантов наблюдали либо сохранение, либо незначительное ухудшение ингибирования, что может свидетельствовать как об отсутствии эффекта, так и о возможном общем ухудшении связывания фенильной части, что само по себе может маскировать менее значительный эффект от связывания радикала (в п-положении или за счет удлинения в ФОУК).

Таким образом, была подтверждена существенная роль остатков bI177 и bW154 в фенилацетильной специфичности есПА. Детальное изучение специфичности к производным ФУК для мутантных форм bI177V и bW154F требует постановки дополнительных экспериментов.

3.9 Мутагенез для изменения эффективности синтеза

3.9.1 Мутации bF24A, bF24A+bF71L, bF24A+bF71L+bF256R

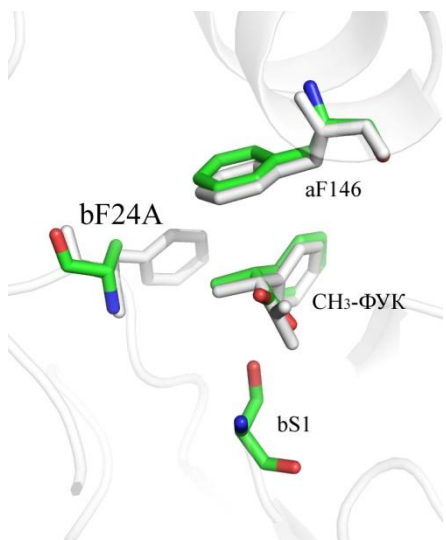


Рисунок 53. есПА ДТ (белый) и bF24A (зеленый) в комплексе с $\text{CaCH}_3\text{-ФУК}$.

Остаток bF24 участвует в формировании боковой стенки гидрофобного кармана и, судя по всему, вовлечен в связывание с фенильным кольцом ацильной части субстрата посредством гидрофобных взаимодействий [93]. Исключительно ароматический F встречается в п/гр 1 и 2 (см. приложение 4), а также в АГЛА, однако для п/гр 4, содержащей bmПА, характерен уже алифатический V (L в ГА), при этом потенциально освободившееся место занимает F, соответствующий bP49 в есПА. При искусственной мутации остатка bF24 на маленький

алифатический А не происходит значительной реорганизации каталитических остатков (рис. 53, pdb 1k7d и 1k5s). Удаление фенильного кольца приводит к появлению дополнительного пространства в связывающем кармане для лучшего размещения Ca -заместителя в (R)-энантиомерах, что объясняет 10-кратное улучшение связывания, наблюдаемое авторами в работе [93]. В работе [94] также установлено, что замены F в позиции bF24 на S, P и C приводят к существенному эффекту увеличения стереоселективности по отношению к (R)-ФГ.

Ранее было показано, что мутация bF24A, наряду с улучшением параметра S/N для реакций 1-4, приводит к значительному уменьшению параметра α , при использовании эфиров в качестве доноров ацильной части ([92], реакции 1э-4э), что является следствием потери ферментом амидазной активности при сохранении эстеразной, благодаря чему становится возможным разобщение процессов гидролиза сильной амидной (вновь образуемый продукт синтеза) и слабой эфирной связи (исходный донор). В настоящей работе было предложено объединить данный эффект дополнительно с эффектом улучшения α , характерного для мутации bF71L (реакция 1а), а также с эффектом улучшения параметра β , характерного для мутации bF256R (реакция 1а). Таким образом, нами были получены активные мутанты bF24A, bF24A+bF71L, bF24A+bF71L+bF256R, а также плаزمида с мутацией bF24A+bF256R.

В последнем случае наработать активный белок не удалось, судя по всему, по причине его низкой стабильности.

В отношении реакции гидролиза NIPAB для мутанта bF24A наблюдали сильное ухудшение константы специфичности, вызванное как почти 10-кратным уменьшением k_{cat} так и 20-кратным увеличением K_M (табл.39). При этом стоит отметить, что наличие аминокислотной группы в Са положении субстрата заметно улучшает связывание и, в соответствии с [93], наилучшим субстратом для данного мутанта является NIPGB. Мутация bF71L приводит к заметному улучшению обоих кинетических параметров, так что константа специфичности увеличивается почти в 50 раз, по сравнению с одиночным bF24A. «Ухудшающая» мутация bF256R остается в данном случае фактически нейтральной. Следует также отметить, что в отношении термостабильности мутация bF24A не играет сколько-нибудь существенной роли.

Таблица 39. Кинетические параметры гидролиза NIPAB для есПА ДТ и мутантов, содержащих замену bF24A.

Фермент	NIPAB			pH 7,5; 50°C*
	k_{cat} , с ⁻¹	K_M , μM	k_{cat}/K_M	k_{in} , мин ⁻¹
ДТ	28,0±0,6	23,1±0,8	1,2	3,6±0,5·10 ⁻³
bF24A	2,7±0,2	486±19	0,006	3,9±0,1·10 ⁻³
bF24A+bF71L	15±3	55±5	0,27	2,2±0,2·10 ⁻²
bF24A+bF71L+bF256R	12±2	45±3	0,26	4,7±0,2·10 ⁻²

* 0,1M KCl.

В работе [92] было показано, что наибольшего эффекта в улучшении параметра α можно достигнуть в реакции синтеза амоксициллина при использовании донора п-ОН-D-ФГ метилового эфира (2э). В связи с этим нами была детально изучена кинетика данной реакции в отношении рассматриваемых мутантов (табл. 40, рис. 54) и получены интегральные кривые (рис. 55).

Таблица 40. Кинетические параметры в реакции 2э для есПА ДТ и мутантов, содержащих замену bF24A.

Фермент	α	β, M^{-1}	γ	$P_{\text{max}} \%^{**}$
ДТ	15,4*	159±63	0,2±0,1	27% ⁽¹⁾
bF24A	0,4*	367±33	0,07±0,01	93% ⁽²⁾
bF24A+bF71L	0,3±0,1	285±45	0,16±0,03	67% ⁽³⁾
bF24A+bF71L+bF256R	7,9±1,4	356±71	0,016±0,01	78% ⁽²⁾

% - Максимальный выход реакции по амидному компоненту. (*)-данные, полученные в [92] по отношению констант специфичности в реакции гидролиза ампициллина и п-ОН-D-ФГ метилового эфира. ** - максимальный выход для начальных условий $S_0=68 \text{ mM}^{(1)}$, $56 \text{ mM}^{(2)}$, $66 \text{ mM}^{(3)}$ и $N_0=46 \text{ mM}^{(1)}$, $36 \text{ mM}^{(2)}$, $46 \text{ mM}^{(3)}$.

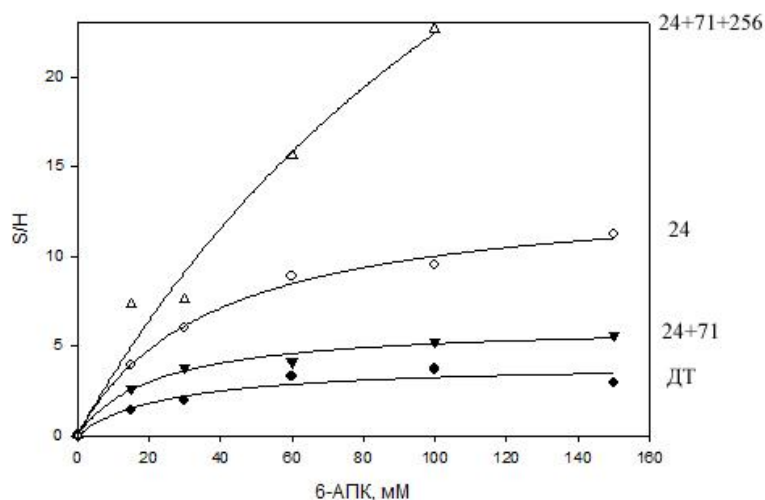


Рисунок 54. Нуклеофильная реакционная способность 6-АПК в реакции 2э для есПА ДТ и мутантов на основе bF24A.

Как видно из табл. 40 и рис. 54, наибольшее улучшение кинетических параметров β и γ характерно для тройного мутанта bF24A+bF71L+bF256R. По сравнению с есПА ДТ параметр β увеличивается более чем в 2 раза, а параметр γ , отвечающий за эффективность ацильного переноса в высококонцентрированных системах уменьшается в 13 раз, что особенно важно для препаративного синтеза. Наряду с этим, у всех мутантов, содержащих

замену bF24A, в 2 раза улучшается параметр относительной специфичности α . Однако, по сравнению с одиночным мутантом bF24A, улучшение параметра α для тройного мутанта в 20 раз менее значительно. Дополнительная мутация bF71L в целом негативно сказывается на эффективных параметрах ацильного переноса по сравнению с одиночным мутантом bF24A.

Для частичного прояснения природы эффекта увеличения параметра β в реакции 2э был проведен анализ влияния отдельных скоростей на соотношение S/H. Как видно из таблицы 41, мутация bF24A приводит к существенному увеличению скоростей синтеза и гидролиза. Можно предположить, что удаление стерического затруднения в области связывания C α -аминогруппы ацильного донора приводит к более эффективному образованию ацилфермента и, как следствие, увеличению скорости лимитирующей стадии. Также следует отметить, что скорость синтеза увеличивается в большей степени, что и приводит к увеличению S/H.

Таблица 41. Влияние отдельных скоростей синтеза и гидролиза на соотношение S/H для иллюстрации влияния замены bF24A.

Фермент	OИ _S	OИ _H	OИ _{S/H}	Условия *
ДТ	1	1	1	
bF24A	12	4	3	Реакция 2э: 30мМ 6-АПК
bF24A+bF71L	9	5	2	Реакция 2э: 30мМ 6-АПК
bF24A+bF71L+bF256R	4	1	4	Реакция 2э: 30мМ 6-АПК

* Эксперименты с мутантными формами проводили в условиях идентичных по отношению к ДТ.

Для апробации эффектов в препаративных условиях нами были получены интегральные кривые в условиях приближенных к максимальной растворимости компонентов реакции. На рисунке 55 видно, что на начальном участке кривых накопления продукта синтеза и гидролиза тройной мутант несколько превосходит одиночный bF24A по соотношению S/H. Однако, через некоторый промежуток времени (на рисунке 30-ая минута) начинает сказываться ухудшающий эффект α (7,9 по сравнению с 0,4). Продукт начинает

гидролизаться быстрее, чем в случае одиночного мутанта, что в конечном итоге приводит в потере максимального выхода (78% по сравнению с 93%).

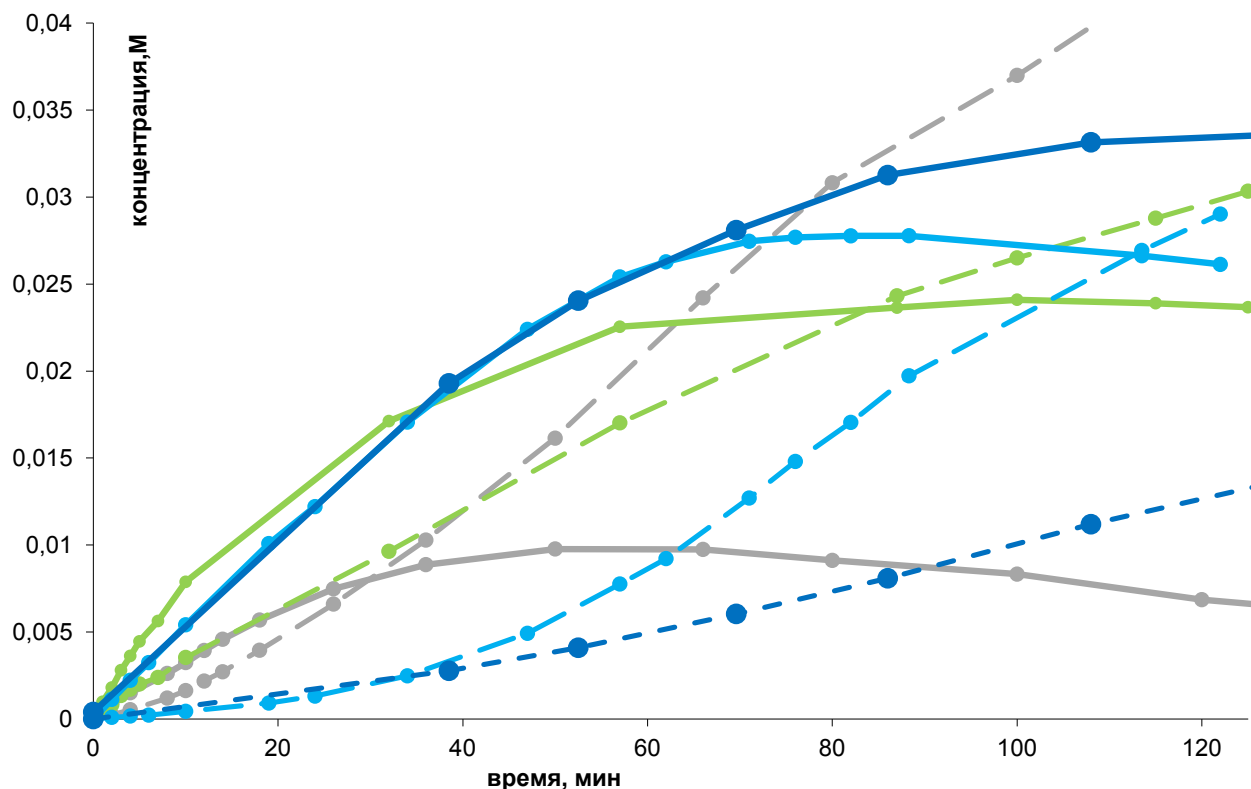


Рисунок 55. Накопление продуктов синтеза (сплошная линия) и гидролиза (пунктир) в реакции 2э для есПА ДТ (серый) и мутантов bF24A+bF71L (зеленый) и bF24A+bF71L+bF256R (голубой), bF24A (синий). Условия реакции: pH 6,3, T=30°C, 36 mM 6-АПК, 56 mM п-ОН-D-ФГ метилового эфира.

Несмотря на это обстоятельство, тройной мутант может быть более эффективен одиночного в таких системах, где наиболее сильно проявляется влияние параметра γ , например, в гетерогенных или пересыщенных растворах [35; 36], а также в системах, где вклад параметра α можно нивелировать, выводя продукт из сферы реакции, например, при помощи солей цинка [128] или бета-нафтола [129].

Для определения стереоспецифичности мутантов, содержащих замену bF24A, проводили стереоселективное ацилирование 2-АБ и ФА метиловым эфиром D-ФГ (табл. 42 и 43).

Таблица 42. Стереоселективность, каталитическая активность и эффективность ацильного переноса есПА ДТ и мутантов, содержащих замену bF24A, в реакции ацилирования 2-АБ эфиром D-ФГ.

Фермент	2-АБ + D-ФГ эфир			
	$V_0/E_0, c^{-1}$	S/H	Es	э.и. ^{50%}
ДТ	0,7	0,02	3,7±0,6	57%
bF24A	0,8	0,02	20±1	90%
bF24A+bF71L	13,8	0,2	6,1±0,4	72%
bF24A+bF71L+bF256R	3,4	0,1	3,2±0,3	52%

$V_0/E_0 (c^{-1})$ – удельная начальная скорость накопления продукта синтеза. Начальные условия pH 8,0, 30°C, $S_0=N_0=50$ мМ.

Таблица 43. Стереоселективность, каталитическая активность и эффективность ацильного переноса есПА ДТ и мутантов, содержащих замену bF24A, в реакции ацилирования ФА эфиром D-ФГ.

Фермент	ФА + D-ФГ эфир			
	$V_0/E_0, c^{-1}$	S/H	Es	э.и. ^{50%}
ДТ	2,2	0,20	1,2±0,1	9%
bF24A	5,9	0,15	4,6±0,4	64%
bF24A+bF71L	34,2	0,47	6,0±0,1(R)	71%
bF24A+bF71L+bF256R	2,0	0,08	1,8±0,1(R)	29%

$V_0/E_0 (c^{-1})$ – удельная начальная скорость накопления продукта синтеза. Начальные условия pH 8,0, 30°C, $S_0=N_0=50$ мМ.

Из представленных данных следует, что мутация bF24A приводит к 5- и 4-кратному улучшению стереоселективности в реакциях ацилирования 2-АБ и ФА, соответственно, при

сохранении каталитической активности. Дополнительные мутации bF71L и bF256R отрицательно сказываются на стереоселективности. Добавление мутации bF71L приводит к значительному увеличению каталитической активности. Параметр S/N в случае 2-АБ для двойного мутанта также существенно увеличивается.

Таким образом, мутация bF24A, действительно, может быть также рекомендована для увеличения параметров эффективности ацильного переноса в случае использования эфиров в качестве ацильного донора. Введение дополнительной мутации bF256R положительно сказывается на параметре γ . Также впервые показано положительное влияние мутации bF24A на стереоселективность в реакциях ацилирования аминоспиртов эфиром D-ФГ.

3.9.2 Мутация *aS149R*

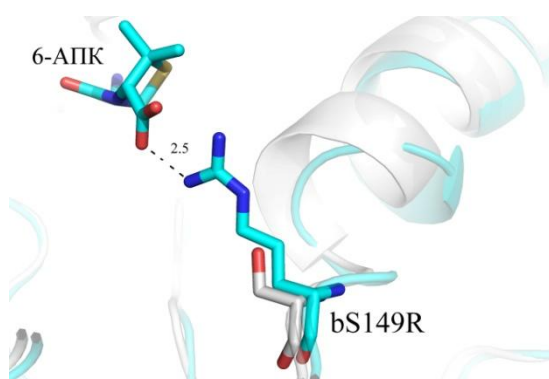


Рисунок 56. Ацилфермент-нуклеофильный комплекс есПА ДТ (белый) и *aS149R* (голубой). Структуры получены Строгановым консервативен.

О.В.

Нами предполагается, что замена остатка на аргинин и, следовательно, введение дополнительного положительного заряда приведет к улучшению связывания карбоксильной группы 6-АПК. Как видно из рис. 56, в структуре ацилфермент-нуклеофильного комплекса мутанта *aS149R*, полученной при помощи методов молекулярной динамики, гуанидиновая группа аргинина и карбоксильная 6-АПК действительно сближены, а значит есть возможность для формирования дополнительного взаимодействия.

Согласно полученным данным (табл. 44), мутация *aS149R* не приводит к существенным изменениям в кинетических параметрах реакции гидролиза NIPAB. В отношении термостабильности наблюдается 2-кратное увеличение константы инактивации при 50°C, что предположительно можно приписать, с одной стороны, отталкиванию двух соседних аргининов *aR149* и *aR145*, а с другой, изменению диполя всего спирального региона.

Таблица 44. Кинетические параметры гидролиза NIPAB и термостабильность для есПА ДТ и aS149R.

Фермент	NIPAB			pH 7,5; 50°C
	k_{cat} , с ⁻¹	K_M , μM	k_{cat}/K_M	k_{in} , мин ⁻¹
ДТ	28,0±0,6	23,1±0,8	1,2	6,0±1,0·10 ⁻³
aS149R	31±1	25,0±0,7	1,3	14,0±1,0·10 ⁻³

В реакции синтеза ампициллина (1a) введение мутации aS149R приводит к 3-кратному увеличению параметра β при практически неизменном параметре α . Параметр γ остается таким же, как у есПА ДТ, а максимальный выход при этом увеличивается на 4% (табл. 45). Таким образом, судя по всему, имеет место улучшение связывания карбоксильной группы 6-АПК, причем карбоксильная группа продукта, предположительно, связывается в другом сайте.

Таблица 45. Кинетические параметры в реакции 1a для есПА ДТ и мутанта aS149R.

Фермент	α	β , M ⁻¹	γ	P_{max}^*
ДТ	13±2	57±3	0,05±0,01	26%
aS149R	17±5	158±30	0,04±0,03	30%

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

В таблице 46 представлены данные по стереоселективности в реакциях с рацематами алифатического 2-АБ и ароматического ФА (ФФА). Видно, что для мутанта aS149R наибольшее изменение наблюдается в реакции ацилирования 2-АБ амидом S-МК, где зафиксировано 2-кратное улучшение стереоселективности по отношению к S-энантиомеру.

Таблица 46. Стереоселективность, каталитическая активность и эффективность ацильного переноса есПА ДТ и мутанта аS149R в реакциях с 2-АБ, ФА, а также в реакции гидролиза ФФА.

Фермент	2-АБ + R-МК амид				2-АБ + S-МК амид			
	$V_0/E_0, c^{-1}$	S/H	E_S	э.и. ^{50%}	$V_0/E_0, c^{-1}$	S/H	E_S	э.и. ^{50%}
ДТ	0,4	0,02	12±1	85%	0,3	0,05	2,3±0,1	40%
аS149R	0,2	0,03	8±1	77%	0,1	0,03	5,1±0,5	67%

Фермент	ФА + R-МК амид				Гидролиз ФФА		
	$V_0/E_0, c^{-1}$	S/H	E_S	э.и. ^{50%}	$V_0/E_0, c^{-1}$	E_S	э.и. ^{50%}
ДТ	1,0	0,1	2,8±0,1	47%	0,8	3,5±0,5	55%
аS149R	0,3	0,1	2,6±0,4	44%	0,3	2,9±0,3	48%

Таким образом, мутация аS149R может рассматриваться как потенциальная мишень для улучшения выхода в реакции 1а, а также для дополнительного улучшения стереоселективности в реакциях с 2-АБ.

3.9.3 Мутация bN388Q

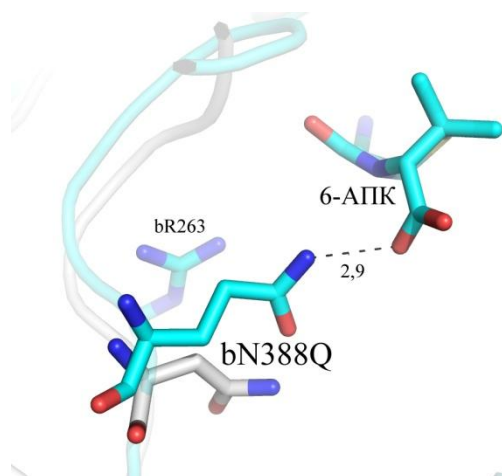


Рисунок 57. Ацилфермент-нуклеофильный комплекс есПА ДТ (белый) и bN388Q (голубой) Структуры получены Строгановым О.В.

Остаток bN388, наряду с остатком bR263, участвует в продуктивном связывании карбоксильной группы бета-лактамного кольца Пен-Г. Однако, продуктивные комплексы нуклеофила 6-АПК и Пен-Г отличаются тем, что в первом случае карбоксильная группа более лабильна и направлена в раствор. Чтобы зафиксировать карбоксильную группу 6-АПК, с целью улучшения связывания было предложено удлинить остаток bN388 на одно метиленовое звено в мутанте bN388Q (рис. 57).

При получении мутанта нами была зафиксирована сильная потеря термостабильности (табл. 47), так что есть видимые основания приписать данному остатку важную структурообразующую функцию. По данным биоинформатического анализа N в позиции b388 является консервативным в п/гр 1 и 2, также в п/гр 4 стоит изоструктурный D и только в п/гр 3, содержащей абПА, обнаруживается Q. Таким образом, можно сделать вывод, что если в природе в каком-либо ферменте встречается определенная мутация, это не дает гарантий, что соответствующая мутация в гомологичном ферменте приведет к сохранению стабильности.

Таблица 47. Кинетические параметры гидролиза NIPAB и стабильность для есПА ДТ и мутанта bN388Q.

Фермент	NIPAB			pH 7; 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	$7,2±0,1 \cdot 10^{-4}$
bN388Q	12,9±0,6	11,2±0,6	1,2	$7,0±0,4 \cdot 10^{-2}$
bN388Q+bF71L	40±2	7,8±0,5	5,2	$1,1±0,1 \cdot 10^{-1}$ *

* pH 7,5

В отношении реакции гидролиза NIPAB для данной мутации характерно асинхронное 2-кратное ухудшение k_{cat} и 2-кратное улучшение связывания K_M так, что константа специфичности практически не меняется. Можно предположить, что улучшение K_M вызвано улучшением связывания карбоксильной группы NIPAB. При этом, возможно, само связывание оказывается менее продуктивным, чем можно объяснить ухудшение k_{cat} . Изменение констант в случае двойного мутанта, выраженные в 5-кратном улучшении константы специфичности, в целом отражает изменение, характерное отдельно для мутации bF71L (см. 3.10.1).

В таблице 48 приведены эффективные кинетические параметры в реакции синтеза ампициллина (1a). Для мутанта bN388Q, действительно, характерно некоторое улучшение параметра β , параметр α не меняется, а параметр γ ухудшается в 3 раза. Мутация bF71L превносит лишь изменения характерные для одиночного мутанта.

Таблица 48. Кинетические параметры в реакции 1a для есПА ДТ и мутантов, содержащих замену bN388Q.

Фермент	α	β, M^{-1}	γ
ДТ	13±2	57±3	0,05±0,01
bN388Q	14±1	185±90	0,17±0,10
bN388Q+bF71L	4,9±0,4	39±4	0,23±0,01

В таблице 49 представлены данные по стереоселективности мутантов в реакциях с рацематами 2-АБ и ФФА. Видно, что для мутанта bN388Q в реакции ацилирования 2-АБ амидом R-МК наблюдается незначительное увеличение стереоселективности, а также каталитической активности и S/H. Комбинация мутаций bN388Q и bF71L не приводят к аддитивности эффектов по стереоселективности и S/H, однако, наблюдается дополнительное увеличение каталитической активности в реакции с амидом R-МК. В реакции с амидом S-МК для двойного мутанта наблюдается 3-кратное улучшение S/H, по сравнению с bF71L, однако почти в 3 раза уменьшается каталитическая активность, при этом влияние на стереоселективность минимально. В случае ФА наблюдается 8-кратное увеличение S/H для двойного мутанта

Таблица 49. Стереоселективность, каталитическая активность и эффективность ацильного переноса есПА ДТ и мутантов на основе bN388Q и bF71L в реакциях ацилирования 2-АБ.

Фермент	2-АБ + R-МК амид				2-АБ + S-МК амид			
	$V_0/E_0, c^{-1}$	S/H	E_S	э.и. ^{50%}	$V_0/E_0, c^{-1}$	S/H	E_S	э.и. ^{50%}
ДТ	0,4	0,02	12±1	85%	0,3	0,05	2,3±0,1	39%
bF71L	1,9	0,30	54±15	96%	0,1	0,16	1,7±0,2(R)	26%
bN388Q	0,6	0,03	19±4	90%	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.
bN388Q+bF71L	3,1	0,28	37±7	95%	0,05	0,5	1,6±0,1(R)	23%

В реакции ацилирования ФА для точечного мутанта наблюдается понижение каталитической активности в 3,5 раза, при этом стереоселективность и синтетическая способность мутанта практически не меняются (табл. 50). Для двойного мутанта наблюдается 2-кратное улучшение стереоселективности по сравнению с одиночным bF71L.

Таблица 50. Стереоселективность, каталитическая активность и эффективность ацильного переноса есПА ДТ и мутантов на основе bN388Q и bF71L в реакции ацилирования ФА.

Фермент	ФА + R-МК амид			
	$V_0/E_0, c^{-1}$	S/H	E_S	э.и. ^{50%}
ДТ	1,0	0,1	2,8±0,1	57%
bF71L	4,4	1	27±1	93%
bN388Q	0,3	0,1	2,7±0,2	46%
bN388Q+bF71L	3,8	0,85	48±4	96%

Интересным является факт, что в реакции ацилирования 2-АБ комбинация мутаций bN388Q и bF71L приводит к ухудшению стереоселективности по сравнению с одиночной

bF71L, а в реакции ацилирования ФА та же комбинация мутаций приводит к улучшению стереоселективности по сравнению с одиночной bF71L, несмотря на то что стереоселективность точечного мутанта bN388Q в обоих случаях практически не меняется.

Таким образом мутация bN388Q в комбинации с bF71L может рассматриваться как фактор улучшения стереоселективности в реакции ацилирования ФА амидом R-МК. Однако, следует принимать во внимание значительное ухудшение термостабильности.

3.9.4 Мутации bF256R, bA255R

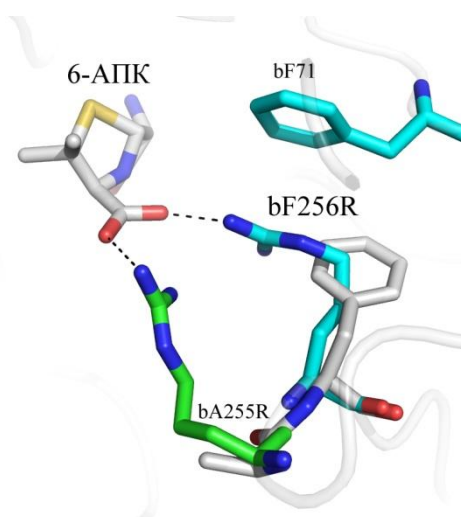


Рисунок 58. Ацилфермент-нуклеофильные комплексы есПА ДТ (белый), bF256R (голубой) и bA255R (зеленый). Структуры получены Строгановым О.В.

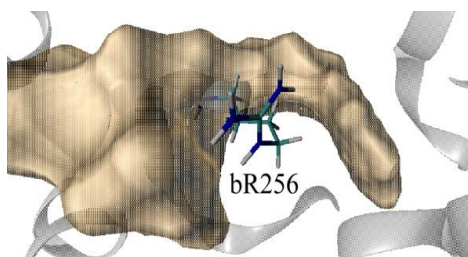


Рисунок 59. Гидрофобное окружение остатка bR256.

Остатки bA255 и bF256 располагаются на самой удаленной от N-концевого серина стенке участка связывания амидной части субстрата и направлены в раствор, в сторону, где находится карбоксильная группа нуклеофила (рис 58). Анализируя распределение аминокислотного состава в позиции b256 внутри семейства ПА, следует отметить строгую гидрофобность остатка (за исключением п/гр 3, представленной abПА), находящуюся в корреляции с позицией b71. Вместе с остатками bF256, bF71, а также bL253 образуют единый протяженный сольватно доступный гидрофобный регион на участке возможного связывания амидной части субстрата в есПА (рис. 59), что несколько отличает есПА от менее гидрофобизированной afПА.

Замена остатков bA255 и bF256 на заряженный аргинин может привести к появлению дополнительных электростатических взаимодействий и фиксации карбоксильной группы (рис. 58), что приведет к улучшению связывания 6-АПК и, как следствие, увеличению β . Как видно из рисунка 58, в структурах ацилфермент-нуклеофильных комплексов, полученных при помощи методов молекулярной динамики, гуанидиновые группы аргинина в обоих мутантах и карбоксильная 6-АПК сближены, а значит есть возможность для формирования дополнительного взаимодействия, при этом для остатка bR256 сохраняется π -стэкинг с остатком bF71, характерный исходно для пары bF256 и bF71.

В ходе работы нами были получены активные мутанты, содержащие вышеуказанные аргининовые замены, а также ранее рассмотренные дополнительные замены bF71L, aS149R и bN388Q. Однако, как оказалось, мутация bF256R приводит к 300-кратному увеличению

константы инактивации при 50°C (табл. 56), что, по всей видимости, отчасти можно приписать внесению заряженного остатка в исключительно неполярное окружение. Интересным оказывается тот факт, что для двойного мутанта bF256R+bF71L термостабильность улучшается в 5 раз по сравнению с bF256R, несмотря на то что одиночная мутация bF71L приводит к ухудшению термостабильности.

При изучении кинетических параметров гидролиза NIPAB были получены данные, представленные в таблице 51.

Таблица 51. Кинетические параметры гидролиза NIPAB для ПА ДТ и мутантов на основе bF256R и bA255R.

Фермент	NIPAB			pH 7,5; 50°C
	k_{cat} , с ⁻¹	K_M , μM	k_{cat}/K_M	k_{in} , мин ⁻¹
ДТ	28,0±0,6	23,1±0,8	1,2	6,0±1,0·10 ⁻³
bF71L	50±2	10±1	5,0	2,2±0,1·10 ⁻²
bF256R	13,7±0,4	27,0±0,8	0,5	1,8±0,2·10 ⁻¹
bF256R+bF71L	18,4±0,9	7,2±0,6	2,6	3,9±0,5·10 ⁻²
bA255R+bF71L	52±2	5,4±0,5	9,7	2,8±0,3·10 ⁻²
bF256R+aS149R	23,7±0,7	67±2	0,4	1,5±0,1·10 ⁻¹
aR145G+bF256R	0,60±0,01	17±1	0,04	3,7±(0,5)·10 ⁻²
bF256R+bN388Q+bF71L	39,4±0,8	5,6±0,5	7,1	2,2±0,4·10 ⁻¹

Мутация bF256R при неизменности K_M приводит к 2-кратному уменьшению k_{cat} , по сравнению с есПА ДТ. Это обстоятельство имеет место и для пары bF71L и bF256R+bF71L. Интересным представляется факт, что мутация соседнего с bF256 остатка в мутанте bA255R+bF71L приводит, наоборот, к 2-кратному увеличению константы по сравнению с одиночным bF71L и к 10-кратному по сравнению с есПА ДТ. В мутанте bF256R+bS149R можно также зафиксировать 3-кратное уменьшение k_{cat}/K_M по сравнению с есПА ДТ, однако уменьшение в этом случае происходит за счет параметра K_M . Этот факт весьма интересен в

силу того, что одиночная мутация bS149R представляется кинетически «нейтральной» (см. 3.2.3.2). В мутанте bF256R+bN388Q+bF71L наблюдается увеличение k_{cat}/K_M по сравнению с bN388Q+bF71L, что также весьма неожиданно, в силу того, что bF256R во всех остальных случаях является «ухудшающей» заменой.

Данные, полученные при изучении реакции синтеза ампициллина, представлены в таблице 52.

Таблица 52. Кинетические параметры в реакции 1a для есПА ДТ и мутантов на основе bF256R и bA255R.

Фермент	α	β, M^{-1}	γ	Pmax *
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 $S_0=N_0=50$ мМ. ** Данные работы [91].

Почти 4-кратного улучшения параметра β можно достичь в случае мутации bF256R. При этом максимальный выход реакции при эквимольном соотношении донора и нуклеофила (50 мМ) составляет 32%, что на 6% превышает выход для есПА ДТ. При использовании более сложного донора ацильной части D-ФГ-глицина удастся поднять максимальный выход с 50% до 64% (данные не представлены). В случае двойного мутанта bF256R+aS149R наблюдается 3-кратное улучшение β . Для мутанта bA255R+bF71L также удастся добиться некоторого улучшения параметра β , что, однако, значительно меньше, чем эффект для мутации по соседнему bF256 остатку. Следует отметить, что замена bF256R

приводит также к 3-кратному увеличению параметра α , что, судя по всему, является результатом улучшения связывания продукта, что, в свою очередь, является следствием улучшения связывания нуклеофила. Однако, введением дополнительной мутации bF71L удается более чем в 2 раза уменьшить параметр α по сравнению с одиночной мутацией при сохранении эффективности ацильного переноса. Наибольший эффект увеличения параметра β (24 раза) был зафиксирован для двойного мутанта aR145G+bF256R. При этом наблюдается синергизм эффектов от отдельных мутаций. Для параметра α также характерно взаимное усиление, но уже негативных эффектов. Параметр γ улучшается в 3 раза по сравнению с одиночной мутацией bF256R.

Для частичного прояснения природы эффекта увеличения параметра β в реакциях 1a и 2э был проведен анализ влияния отдельных скоростей на соотношение S/N. Как видно из таблицы 53, мутация bF256R приводит к существенному уменьшению скорости гидролиза и менее значительному уменьшению скорости синтеза. Можно предположить, что введение положительного заряда в области нахождения карбоксильной группы 6-АПК приводит к улучшению связывания целевого нуклеофила и, как следствие, возможному ослаблению роли конкурирующего нуклеофила – воды. При этом наблюдаемое уменьшение скорости синтеза можно, предположительно, отнести к возможному отклонению положения атакующего нуклеофила от исходного, характерного для ДТ, в котором он обладает большим числом степеней свободы.

Таблица 53. Влияние отдельных скоростей синтеза и гидролиза на соотношение S/N для иллюстрации влияния замены bF256R.

Фермент	ОИ _S	ОИ _H	ОИ _{S/H}	Условия *
ДТ	1	1	1	
bF256R	0,7	0,1	5	Реакция 1a: 50 мМ 6-АПК
bF24A+bF71L	9	5	2	Реакция 2э: 30 мМ 6-АПК
bF24A+bF71L+bF256R	4	1	4	Реакция 2э: 30мМ 6-АПК

* Эксперименты с мутантными формами проводили в условиях идентичных по отношению к ДТ.

При изучении стереоселективности в реакциях с аминспиртами было обнаружено, что мутация bF256R приводит к увеличению стереоселективности в реакции ацилирования 2-АБ амидом R-МК по сравнению с есПА ДТ (табл. 54). В 3 раза при этом улучшается параметр S/N. При комбинации с мутацией bF71L для двойного мутанта bF256R+bF71L наблюдается 2-кратное улучшение стереоселективности по сравнению с одиночным мутантом и 9-кратное по сравнению с есПА ДТ. Такая стереоселективность вполне достаточна для получения оптически чистого продукта (э.и. 98% при условии 50% конверсии). Еще больший эффект (13 раз) достигается при введении дополнительной мутации bN388Q в мутанте bF256R+bN388Q+bF71L (э.и. 99%), для которого также характерно высокое значение S/N и каталитической активности, что делает его наиболее привлекательным для решения поставленной задачи. Также высокой оптической чистоты можно достичь в случае мутанта bA255R+bF71L. Введение дополнительной мутации aR145G приводит к 2-кратному увеличению стереоселективности и S/N по сравнению с одиночной заменой bF256R.

Таблица 54. Стереоселективность, каталитическая активность и эффективность ацильного переноса есПА ДТ и мутантов на основе bF256R и bA255R в реакции ацилирования 2-АБ.

Фермент	2-АБ + R-МК амид				2-АБ + S-МК амид			
	$V_0/E_0, c^{-1}$	S/N	E_S	э.и. ^{50%}	$V_0/E_0, c^{-1}$	S/N	E_S	э.и. ^{50%}
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%
bF256R	0,3	0,06	17±3	89%	0,04	0,06	1,6±0,2	23%
bF256R+bF71L	0,6	0,54	111±8	98%	0,03	1,2	1,3±0,2(R)	13%
bA255R+bF71L	2,0	0,26	82±7	98%	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.
bF256R+aS149R	0,04	0,04	12±2	85%	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.
bF256R+bN388Q+bF71L	0,8	0,34	160±(10)	99%	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.
aR145G+bF256R	0,2	0,13	35±6	94%	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.

В реакции ацилирования ФА (табл. 55) введение мутации bF256R приводит к почти 3-кратному увеличению стереоселективности, однако добавление мутации bF71L не приводит к аддитивному эффекту, в отличие от комбинации bA255R+bF71L, где наблюдается 2-кратное увеличение стереоселективности по сравнению с одиночным bF71L и более чем 20-кратное по сравнению с есПА ДТ. Интересно отметить, что мутации bF256R и bA255R, которые приводят к заметному улучшению параметров S/H и β в реакции синтеза ампициллина, в данном случае не влияют на эффективность ацильного переноса, в то время как мутация bF71L, приводящая к ухудшению параметров в случае ампициллина, в отношении ацилирования ФА приводит к многократному улучшению эффективности переноса.

Таблица 55. Стереоселективность, каталитическая активность и эффективность ацильного переноса есПА ДТ и мутантов на основе bF256R и bA255R в реакции ацилирования ФА.

Фермент	ФА + R-МК амид			
	$V_0/E_0, c^{-1}$	S/H	E_S	э.и. ^{50%}
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 β в реакциях синтеза бета-лактамных антибиотиков, а также, наряду с bA255R и в комбинации с мутацией bF71L, для эффективного разделения рацематов аминокислот. Однако, следует принимать во внимание ухудшение стабильности при введении аргининовых мутаций.

3.10 Мутагенез для изменения стереоселективности

3.10.1 Мутации bF71L, bF71A

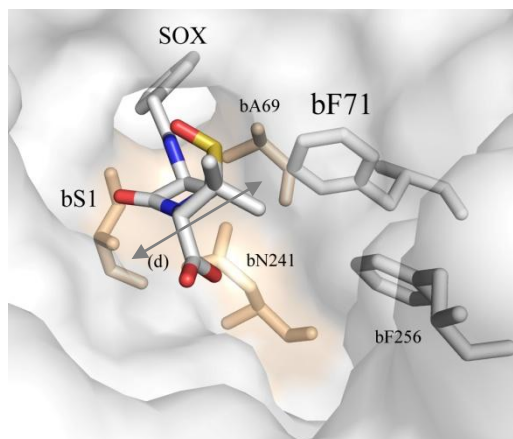


Рисунок 61. Остаток bF71 в смещении bF71, диаметр горлышка (d) увеличивается с структуре есПА (1gm9). 6.5 до 8.5 Å, и остаток bN241 оказывается более доступным для растворителя, что приводит к дестабилизации оксианионного центра.

Остаток bF71 находится в области связывания амидной части субстрата, образуя Ван-дер-Ваальсовы контакты с тиазолидиновым кольцом, а также частично формирует горлышко гидрофобного кармана (рис. 61). Также остаток bF71 выполняет роль «зонтика», экранируя остатки оксианионного центра от воды. В закрытой конформации остаток находится в стэкинге с bF256. При переходе в открытую конформацию и смещении bF71, диаметр горлышка (d) увеличивается с 6.5 до 8.5 Å, и остаток bN241 оказывается более доступным для растворителя, что приводит к дестабилизации оксианионного центра.

В семействе ПА позиция b71 является высокогруппспецифичной. В подгруппе 1, содержащей есПА, остаток в основном представлен F. Аналогично в подгруппе 4, содержащей bmПА, встречается исключительно Y, который дополнительно фиксируется E (bG385 в есПА), существенно прикрывая тем самым карман связывания. Следует отметить, что в обоих случаях в «комплементарной» позиции b256, за некоторым исключением, представлены аминокислоты, способные образовать пару для стэкинга. В случае п/гр 2, содержащей afПА, в позиции b71 находится жесткий P, который в случае afПА спрятан внутри белковой глобулы и не контактирует с субстратом. При этом боковую стенку формирует уже bY254, соответствующий bF256 в есПА (рис. 62). Интересно отметить, что в данном случае отсутствие стэкинг пары также открывает доступ к сольватно доступной полости, которой нет у есПА (X, рис. 62). Следует обратить внимание, что в позиции b71 также встречаются и маленькие аминокислоты, такие как A (п/г 1) и S (п/г 3), что может приводить к расширению субстратной специфичности, ввиду, по крайней мере, увеличения свободной области связывания амидной части. Однако, отсутствие экспериментальных данных по соответствующим ПА не позволяет проверить предположение.

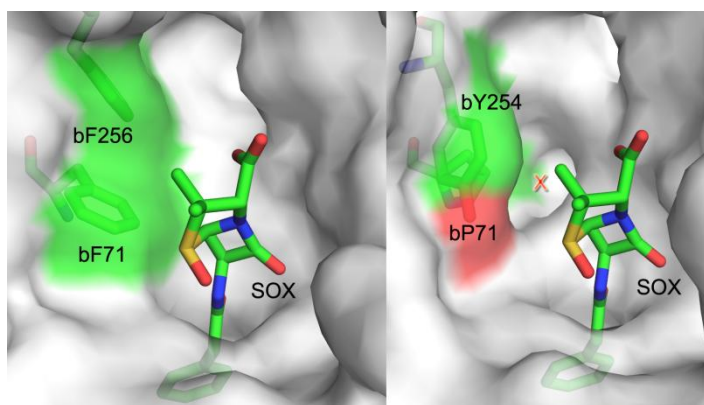


Рисунок 62. Сравнение структур есПА:1gm9 (слева) и аfПА:3k3w (справа).

В литературе описаны мутантные формы есПА, содержащие замены в позиции bF71. Принимая во внимание указания первых работ по «направленной эволюции» есПА, в работе [95] авторы получили и детально изучили мутанты bF71C и bF71L. Было обнаружено 5-10-кратное увеличение константы специфичности в реакции гидролиза NIPAB. В работе [48] изучали стереоспецифичность мутанта bF71L в реакциях ацилирования алифатических и ароматических аминоспиртов. Было показано 3-4-кратное улучшение стереоселективности в реакциях с 2-АБ и ФА по сравнению с есПА ДТ.

Согласуясь с предшествующими работами в отношении кинетики гидролиза NIPAB, нами были получены данные, представленные в таблице 56. Так, для мутанта bF71L характерно 4-кратное, а для bF71A почти 2-кратное улучшение константы специфичности. При этом наблюдается относительно малое 3-4-кратное падение термостабильности.

Таблица 56. Кинетические параметры гидролиза NIPAB и стабильность для есПА ДТ и мутантов bF71L/A.

Фермент	NIPAB			pH 7,5; 50°C
	k_{cat} , с ⁻¹	K_M , μM	k_{cat}/K_M	k_{in} , мин ⁻¹
ДТ	28,0±0,6	23,1±0,8	1,2	6,0±1,0·10 ⁻³
bF71L	50±2	10±1	5,0	2,2±0,1·10 ⁻²
bF71A	21±2	9±1	2,3	1,6±0,2·10 ⁻²

В реакции 1а для мутанта bF71L наблюдается более чем 2-кратное улучшение параметра относительной специфичности α , однако немного уменьшается параметр β . Параметр γ ухудшается более значительно (табл. 57).

Таблица 57. Кинетические параметры в реакции 1а для есПА ДТ и мутанта bF71L

Фермент	α	β, M^{-1}	γ
ДТ	13±2	54±6	0,05±0,01
bF71L	7±1	40±3	0,30±0,03

Для прояснения природы эффекта уменьшения β в реакциях 1а и 2э был проведен анализ влияния отдельных скоростей на соотношение S/H. Как видно из таблицы 58 мутация bF71L во всех приведенных примерах приводит к асинхронному увеличению скорости гидролиза и уменьшению скорости синтеза. Можно предположить, что удаление гидрофобного взаимодействия в области связывания бета-лактамного кольца приводит к ухудшению связывания целевого нуклеофила и, как следствие, возможному усилению роли конкурирующего нуклеофила - воды.

Таблица 58. Влияние отдельных скоростей синтеза и гидролиза на соотношение S/H для иллюстрации влияния замены bF71L.

Фермент	OI _S	OI _H	OI _{S/H}	Условия *
ДТ	1	1	1	
bF71L	0,5	3	0,2	Реакция 1а: 50** (bF71L)/70 (ДТ) мМ 6-АПК
bF24A	12	4	3	Реакция 2э: 30 мМ 6-АПК
bF24A+bF71L	9	5	2	Реакция 2э: 30 мМ 6-АПК
bF256R	0,7	0,1	5	Реакция 1а: 50 мМ 6-АПК
bF256R+bF71L	0,6	0,3	2	Реакция 1а: 200 мМ 6-АПК

* Эксперименты с мутантными формами проводили в условиях идентичных по отношению к ДТ (кроме**).

В отношении стереоспецифичности для мутанта bF71L, действительно, почти 5-кратное улучшение стереоселективности в реакции ацилирования алифатического 2-АБ амидом R-МК (табл. 59), более значительное, чем описано в работе [48] для гидролиза N-(R)-манделил-2-АБ, однако меньшее по абсолютной величине. Также для данной мутации характерно 15-кратное улучшение параметра S/H и почти 5-кратное улучшение каталитической активности (см. патентную заявку [130]). Еще большего увеличения удастся достичь при замене остатка bF71 на А, так что расчетное значение оптической чистоты при полной конверсии активного энантиомера составляет удовлетворительное значение 98%. В реакции ацилирования 2-АБ амидом S-МК наблюдается инверсия активной формы, так что более активным становится R-энантиомер.

Таблица 59. Стереоселективность, каталитическая активность и эффективность ацильного переноса есПА ДТ и мутантов bF71L/А в реакциях ацилирования 2-АБ.

Фермент	2-АБ + R-МК амид				2-АБ + S-МК амид			
	$V_0/E_0, c^{-1}$	S/H	E_s	э.и. ^{50%}	$V_0/E_0, c^{-1}$	S/H	E_s	э.и. ^{50%}
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-МК ароматического ФА, наряду с 10-кратным улучшением S/H и более чем 3-кратном увеличением скорости реакции, наблюдается еще более значительное улучшение стереоселективности, чем в случае алифатического спирта. Так для bF71L характерно 10-кратное, а для bF71A даже 250-кратное увеличение параметра (табл. 60).

Таблица 60. Стереоселективность, каталитическая активность и эффективность ацильного переноса есПА ДТ и мутантов bF71L/A в реакции ацилирования ФА.

Фермент	<i>ФА + R-МК амид</i>			
	$V_0/E_0, c^{-1}$	S/H	Es	э.и. ^{50%}
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 полученных результатов мы провели множественный докинг образующихся в реакции ацилирования отдельных энантиомеров МФА (рис.63) в структуры есПА ДТ и bF71A.

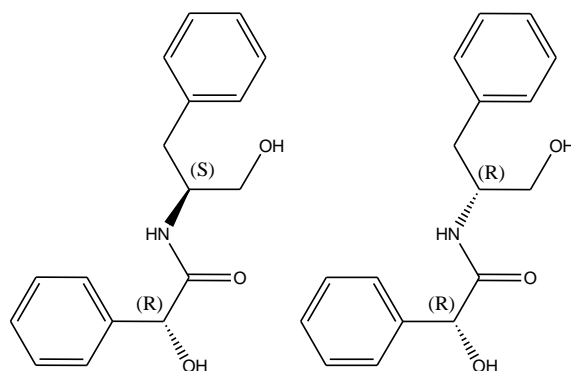


Рисунок 63. Структурные формулы S-МФА (слева) и R-МФА (справа).

Как видно из рисунка 64, 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 с остатком bF71 (рис. 64А), тогда как положение продуктивной конформации R-МФА менее определено (рис. 64Б). Этой ситуации отвечает 0,5 ккал/моль разница средней рассчитанной минимальной энергии связывания (табл. 48).

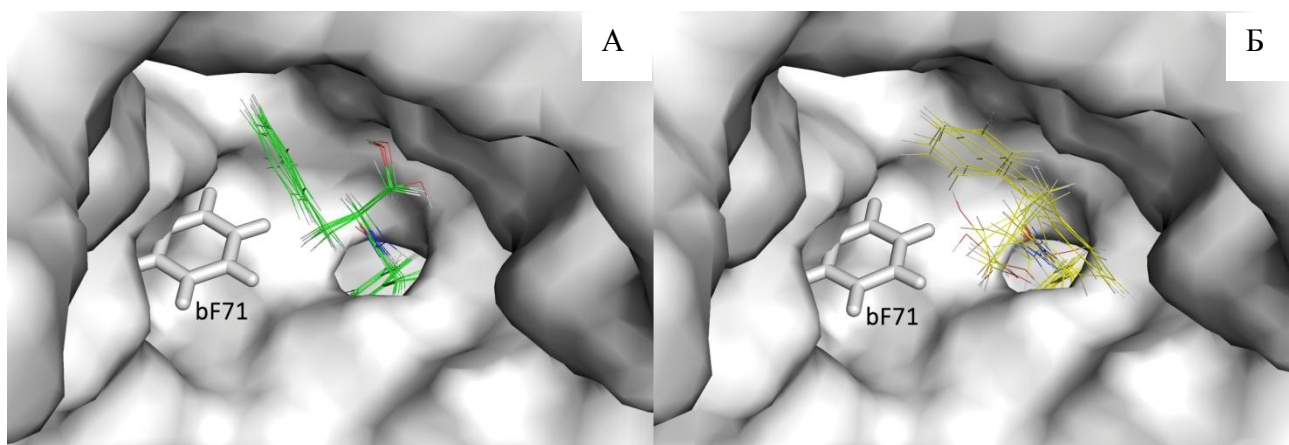


Рисунок 64. Докинг S-МФА (А) и R-МФА (Б) в структуру есПА 1gm9. Представлены результаты 7 докингов для конформаций субстрата, характеризующиеся минимальной рассчитанной энергией связывания.

При удалении фенильного радикала в мутанте bF71A появляется свободное пространство, которое становится доступно для фенильного радикала S-МФА (рис. 65А). В случае с R-МФА картина практически не меняется, положение продуктивной конформации также определено менее строго (рис. 65Б), что находит отражение в более значительной разнице средней рассчитанной минимальной энергии связывания 1 ккал/моль (табл. 61). Это обстоятельство свидетельствует, по крайней мере, о появлении более существенной дискриминации энантиомеров на уровне связывания в случае замены bF71A.

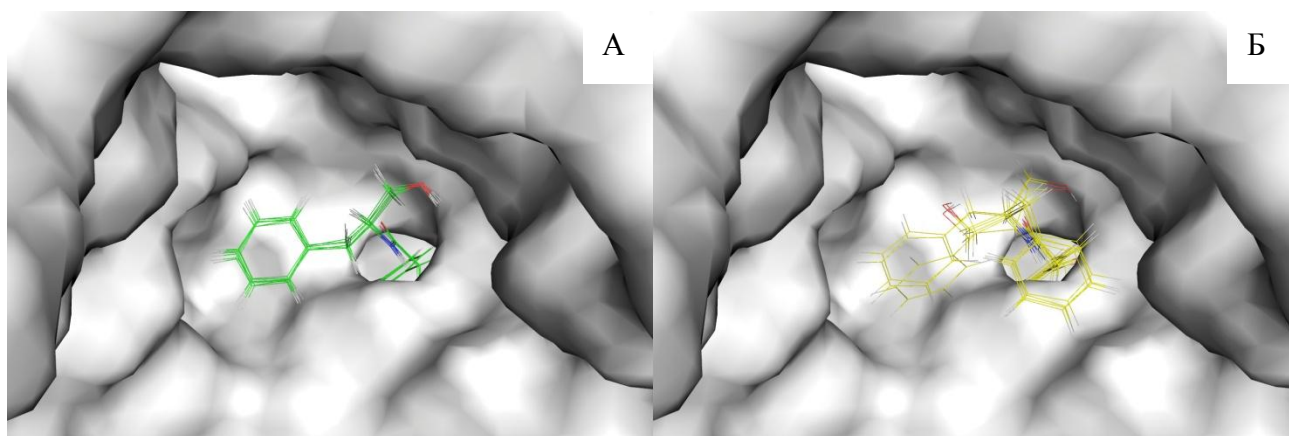


Рисунок 65. Докинг S-МФА (А) и R-МФА (Б) в структуру есПА bF71A. Представлены результаты 7 докингов для конформаций субстрата, характеризующиеся минимальной рассчитанной энергией связывания.

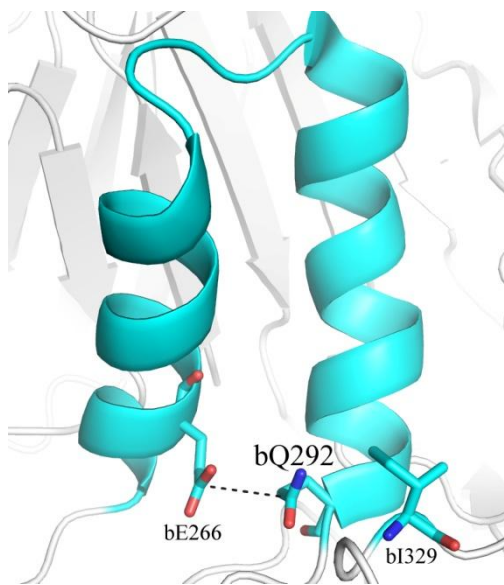
Таблица 61. Средняя рассчитанная минимальная энергия связывания на основании 25 докингов для каждой пары фермент/субстрат с учетом стандартного отклонения.

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, можно подтвердить, что позиция bF71 является важной для специфичности и стереоспецифичности фермента. Мутацию bF71L можно рекомендовать для снижения параметра α в реакции синтеза ампициллина, а также наряду с bF71A для улучшения стереоселективности в реакции ацилирования аминспиртов амидом R-МК. В частности, мутантная форма есПА bF71A может потенциально рассматриваться как катализатор для получения 2-аминобутанола и фенилаланинола в оптически чистой форме.

3.11 Мутагенез для изменения стабильности

3.11.1 Мутации bQ292R, bI329E



С целью улучшения стабильности есПА за счет введения нового электростатического взаимодействия между остатками b292 и b266 нами был получен мутант bQ292R. Расстояние между карбонильными атомами остатков bQ292 и bE266 в структуре 1gm9 составляет 4.2Å, что позволяет говорить о возможности образования солевого мостика между вводимым аргинином и глутаматом. Если такой мостик действительно образуется, то это приводит к формированию нового и единственного контакта между соседними альфа-спиралями, как следствие,

Рисунок 66. Остатки bQ292, bE266 и bI329 в структуре есПА ДТ.

ограничению их подвижности и улучшению стабильности (рис. 66). Для дополнительной фиксации аргинина также была предложена мутация bI329E. Следует отметить, что подобная система мостиковых взаимодействий реализуется у ксПА (единичный случай среди всех ПА, п/гр1), характеризующейся расширенным в обе стороны профилем рН-стабильности [73]. Также в 70% случаев у ГА и в 30% у АГЛА в позиции, соответствующей b292 в есПА, присутствует R. В работе [131] методами биоинформатики была построена структура ксПА, что позволило определить ионные взаимодействия, отвечающие как за стабильность ксПА, так и за различия между ксПА и есПА. Было показано, что в есПА bR291 образует ионное взаимодействие с bE475, которое может оказывать существенный вклад в стабильность фермента. У фермента ксПА остаток bR291 сдвинут на одну позицию за счет вставки лейцина (см. приложение 1.1). Это делает невозможным контакт bR291 с bE475 (как у есПА), но делает аргинин доступным для тройного взаимодействия с bE327, bD325 и bE265 (соответственно bI329, bD327 и bE266 у есПА). Таким образом, в двойном мутанте bQ292R+bI329E для есПА могут быть реализованы все вышеуказанные ионные взаимодействия, характерные для ксПА.

Для изучения термостабильности нами были проведены серии экспериментов по определению остаточной активности от времени при температуре 50°C и pH 7. Известно, что для ПА термоинактивация представляет собой реакцию, характеризующуюся первым порядком. Таким образом, величину константы инактивации определяли при экстраполяции полученных экспериментальных данных экспоненциальной кривой (табл. 62).

Таблица 62. Константы инактивации для есПА дикого типа и мутантов на основе bQ292 (pH 7,0; 50°C).

Фермент	$k_{in}, \text{мин}^{-1}$
ДТ	$7,2 \pm 0,1 \cdot 10^{-4}$
bQ292R	$2,1 \pm 0,2 \cdot 10^{-3}$
bI329E	$3,0 \pm 0,2 \cdot 10^{-2}$
bQ292R+bI329E	$2,2 \pm 0,3 \cdot 10^{-3}$

Исходя из полученных данных можно сделать вывод, что мутация bQ292R практически не сказывается на термостабильности фермента, а мутация bI329E вносит значительный дестабилизирующий эффект. Интересно отметить, что в случае двойного мутанта негативный эффект от мутации bI329E нивелируется.

Для изучения щелочной стабильности эксперименты проводили при температуре 25°C и pH 10 (табл.63).

Таблица 63. Константы инактивации для есПА дикого типа и мутантов на основе bQ292 (pH 10,0; 25°C).

Фермент	$k_{in}, \text{мин}^{-1}$
ДТ	$2,2 \pm 0,1 \cdot 10^{-3}$
bQ292R	$1,1 \pm 0,1 \cdot 10^{-2}$
bQ292R+bI329E	$8,3 \pm 0,2 \cdot 10^{-3}$

Данные, представленные в таблице 2 свидетельствуют о негативном влиянии мутации bQ292R на щелочную стабильность фермента - константа инактивации увеличивается на порядок. Мутация bI329E вносит незначительный позитивный вклад в случае двойного мутанта.

Однако, положительный эффект от мутации bQ292R можно наблюдать в области кислых рН. Нами были дополнительно поставлены эксперименты при рН 4,0 и 5,0 (0,1 М ацетатный буфер, T=50°C). Из таблицы 64 видно, что позитивный эффект усиливается при уменьшении рН, а также при внесении фиксирующей мутации.

Таблица 64. Константы инактивации для есПА дикого типа и мутантов (рН 4,0 и 5,0; 50°C).

Фермент	$k_{in}, \text{мин}^{-1}$	
	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	$8,8 \pm 0,5 \cdot 10^{-3}$	$2,8 \pm 0,4 \cdot 10^{-4}$

Так, для двойного мутанта bQ292R+bI329E можно наблюдать 2-кратное улучшение стабильности при рН 4 по сравнению с нативным ферментом есПА. Этот факт может свидетельствовать об активации новых мостиковых взаимодействий характерных для ксПА при низких рН.

3.11.2 Мутации bD484N, bD484H

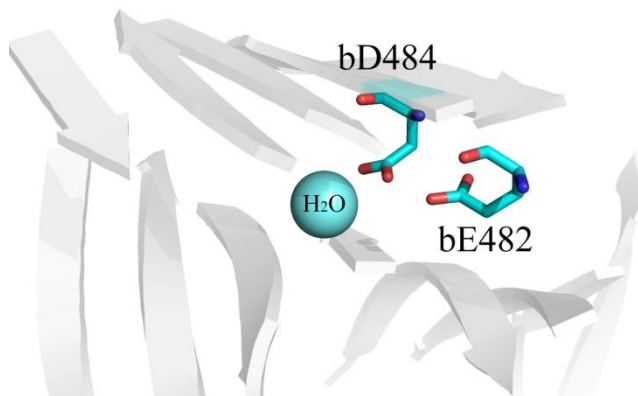


Рисунок 67. Остатки bD484 и bE482 в структуре есПА ДТ, а также молекула воды, координирующая параллельные бета-листы.

Остаток bD484 расположен с «обратной» стороны активного центра, в одном бета-листе с каталитическим серином, находящемся в структуре альфа-бета-бета-альфа домена. В непосредственной близости располагается такой же кислотный bE482 (рис. 67), который по расчетам программы «Прокка» имеет аномально высокий рКа и, вероятно, образует водородную связь с отрицательно заряженным bD484 (рис. 68А). При высоких рН происходит частичное депротонирование и реализуется

отталкивание соседних кислотных групп, что приводит, в конечном итоге, к потере координации воды, разъезжанию двух параллельных бета-листов и заполнению пространства растворителем (рис. 68В, [132]).

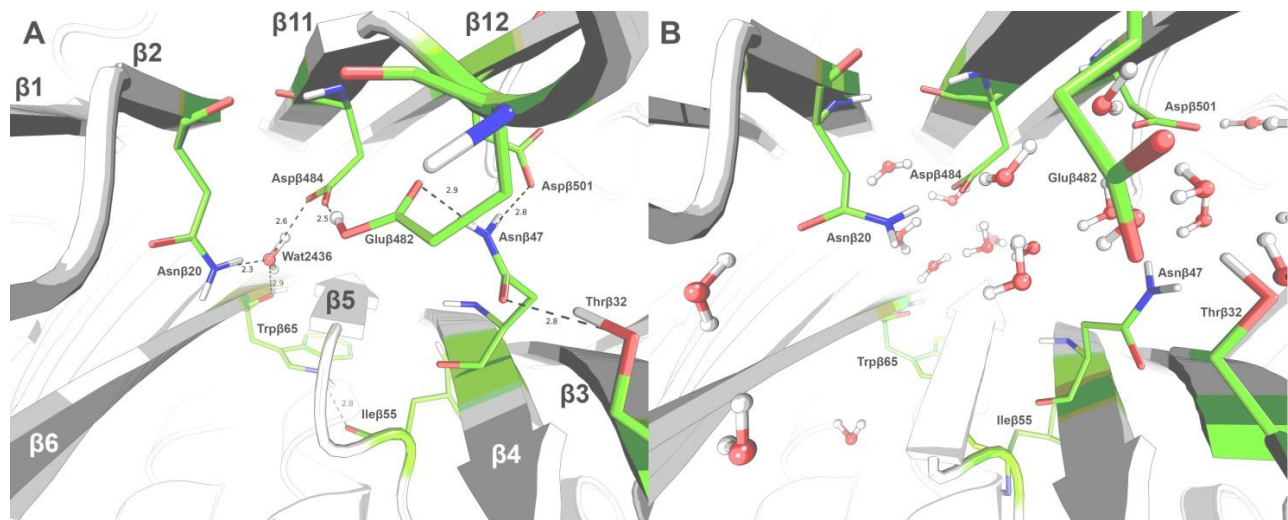


Рисунок 68. А: Сеть водородных взаимодействий есПА ДТ в регионе, содержащем остатки bE482-bN484, при рН 7,5 и В: разрушение взаимодействий при рН 10,0 [132].

По данным биоинформатического анализа остатки b484 и b482 являются высокогруппспецифичными. D в позиции b484 присутствует в 50% ПА п/гр 1, содержащей

есПА, другие же 50% представлены N. В п/гр 2 N присутствует уже в 80% ПА, в том числе в afПА, характеризующейся наиболее высокой щелочной стабильностью. В п/гр 4, содержащей bmПА, также характеризующуюся повышенной щелочной стабильностью, наблюдается исключительно H. При этом в большинстве описанных случаев (80%) в позиции b482 присутствует «комплементарный» E. 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, предположительно, для п/гр 1, 2 и 4, заменяется, по всей видимости, гидрофобным кластером в случае п/гр 3.

В данной работе [132] нами были получены активные мутанты bD484N и bD484H, по аналогии с afПА и bmПА, соответственно. В реакции гидролиза NIPAB мутации по данному остатку приводят к незначительному изменению каталитической константы и к почти 2-кратному улучшению K_M (табл. 65). При изучении щелочной стабильности нами было зафиксировано 9-кратное уменьшение константы инактивации при pH 10 в случае мутации bD484N. При этом, как и следовало, не наблюдали эффекта стабилизации при 50°C в области нейтральных pH. Также было показано, что данный эффект не связан с изменениями каталитических свойств при увеличении pH. Весьма интересным оказалось, что наряду с щелочной стабильностью, улучшается операционная стабильность при использовании высоких концентраций реагентов (данные не представлены). Что касается мутации bD484H, то ее введение приводит к ухудшению щелочной и термостабильности (на порядок). Это может быть вызвано несоответствием размеров заменяемого остатка и доступной для того полости.

Таблица 65. Кинетические параметры гидролиза NIPAB и стабильность для есПА ДТ и мутантов bD484N/H.

Фермент	NIPAB			<i>pH 7,5; 50°C*</i> ,** <i>pH 10; 25°C**</i>	
	k_{cat}, c^{-1}	$K_M, \mu M$	k_{cat}/K_M	$k_{in}, \text{мин}^{-1}$	$k_{in}, \text{мин}^{-1}$
ДТ	28,0±0,6	23,1±0,8	1,2	$9 \pm 1 \cdot 10^{-3}$	$2,6 \pm 0,8 \cdot 10^{-3}$
bD484N	19,5±0,9	14,8±0,5	1,3	$8 \pm 1 \cdot 10^{-3}$	$2,9 \pm 0,1 \cdot 10^{-4}$
bD484H	22,6±(0,9)	14,9±(0,5)	1,5	$8 \pm 1 \cdot 10^{-2}$	$7,5 \pm 0,9 \cdot 10^{-3}$

*0,1 М КСl, ** по результатам трех независимых экспериментов.

При сравнении стабильности мутанта bD484N с природными ферментами afПА и bmПА, обладающими сдвинутыми в область щелочных рН профилями каталитической активности нами были получены диаграммы, приведенные на рисунке 69.

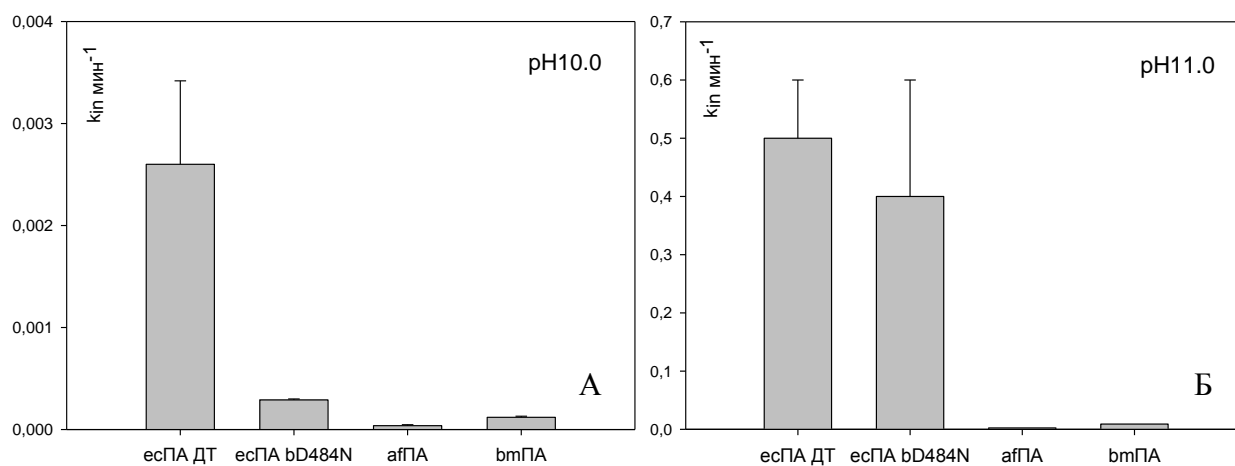


Рисунок 69. Щелочная стабильность пенициллинацилаз. Условия: рН 10,0, 10мМ CAPS, 25°C (А), рН 11,0, 100мМ CAPS, 25°C (Б). Приведены данные для серии из 3-х независимых экспериментов.

Несмотря на многократное улучшение стабильности по сравнению с есПА ДТ при рН 10, величина константы инактивации для есПА bD484N, сравниваемая с константой для bmПА, все еще на порядок превышает константу для afПА. Исчезновение эффекта стабилизации при

pH 11 можно, предположительно, отнести к более существенной глобальной потере стабильности, на фоне которой эффект от одиночной мутации едва может быть замечен.

Для объяснения эффекта стабилизации при pH 10, нами были рассчитаны молекулярно-динамические траектории для региона, содержащего остатки b484-b482, для есПА ДТ и мутантной формы bD484N на отрезке 50 нс. Как видно из рисунка 70, при pH 10 для есПА ДТ наблюдается значительное изменение подвижности региона (красная кривая), что соответствует картине, представленной на рис.68В, которая реализуется вследствие отталкивания одноименных зарядов. В случае мутанта bD484N отталкивания не происходит, что находит отражение в отсутствии заметных изменений в подвижности региона (зеленая кривая). Более детальное объяснение механизма pH-индуцированной дестабилизации и описание молекулярно-динамических расчетов для других регионов есПА ДТ и bD484N представлено в работе [132].

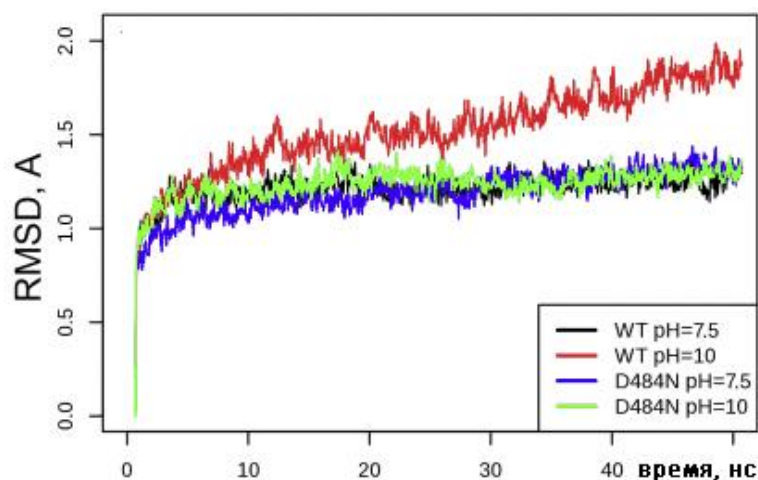


Рисунок 70. Молекулярно-динамические траектории для региона, содержащего остатки bE482-bN484 [132].

Высокая стабильность фермента в щелочных условиях может быть использована при проведении реакций ацильного переноса. При высоких pH активность реакционноспособной аминокетильной группы, а также растворимости многих субстратов существенно увеличиваются. Для иллюстрации каталитических способностей мутанта bD484N в таких условиях нами была проведена реакция синтеза цефалексина при pH 9,0 (рис. 71). Как видно из рисунка, активность bD484N сохраняется на существенно большем временном интервале по

сравнению с ДТ, что приводит к 5-кратному увеличению выхода целевого антибиотика для данных условий (см. патент [133]).

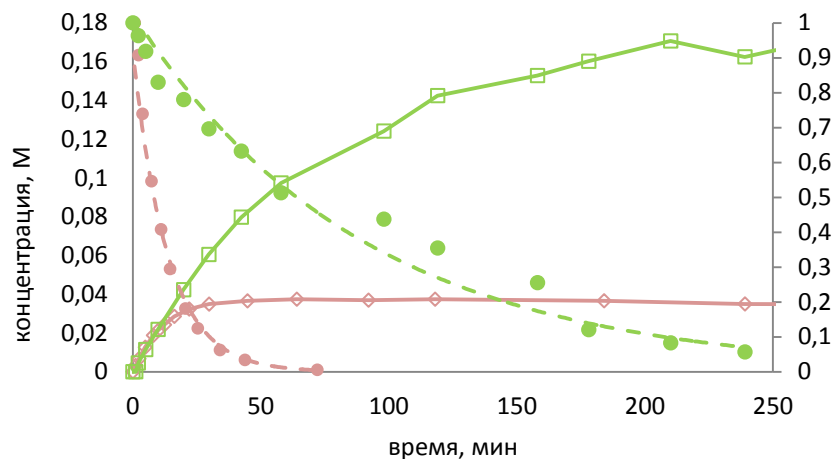


Рисунок 71. Синтез цефалексина для есПА ДТ (красный) и bD484N (зеленый). Кривые накопления продукта синтеза (сплошная линия) и активность фермента (пунктир). Правая ось ординат - доли остаточной активности. Условия реакции: 0,5 М 7-АДЦК, 0,5 М D-ФГ амида, рН 9,0.

Аналогичную картину можно наблюдать при синтезе дипептидов. Так, при переносе ацильной группы D-ФГ амида на глицин при рН 9,5 можно также получить 5-кратное увеличение выхода реакции: с 19% для есПА ДТ до 87% для bD484N (рис.72).

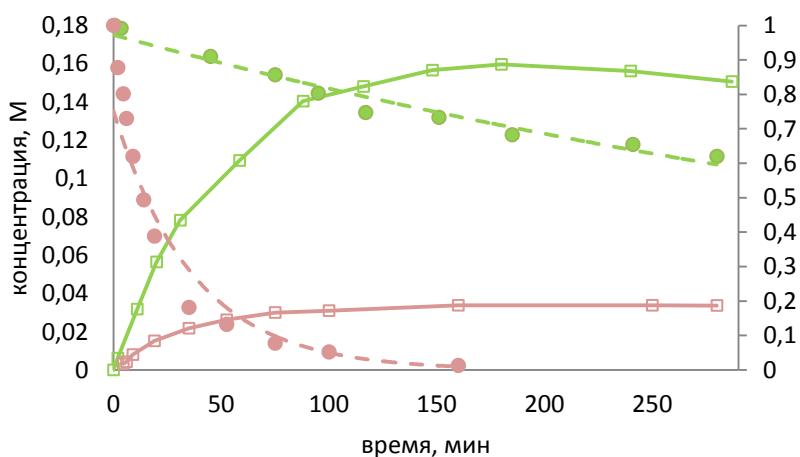


Рисунок 72. Синтез D-ФГ-глицина для есПА ДТ (красный) и bD484N (зеленый). Кривые накопления продукта синтеза (сплошная линия) и активность фермента (пунктир).

Правая ось ординат - доли остаточной активности. Условия реакции: 0,18 М глицина, 0,18 М D-ФГ амида, рН 9,5.

Также высокая щелочная стабильность фермента может быть использована в процедурах щелочного выделения и очистки, когда на первом этапе проводят щелочную денатурацию, а затем при снижении рН избавляются от посторонних компонентов. Однако, отработка методики требует проведения дополнительных экспериментов.

Подводя итоги, мутацию bD484N, таким образом, можно рекомендовать в качестве фактора улучшения щелочной и операционной стабильности. Представленное выше объяснение механизма щелочной дестабилизации также имеет фундаментальное и практическое значение.

3.11.3 Мутация bR297A

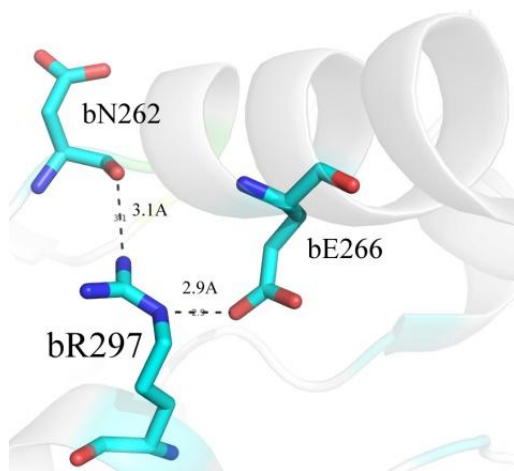


Рисунок 73. Остаток bR297 в структуре есПА и его полярные контакты.

В работе [134] проводили «аланиновое сканирование» поверхностных остатков, образующих солевые мостики. Было показано, что их вклад в стабильность составляет приблизительно 1 ккал/моль, что в 3-4 раза меньше, чем эффект от внутренних солевых мостиков. Внутренние солевые мостики могут играть существенную роль в поддержании структуры [79]. Также они могут выступать как потенциальные мишени для улучшения термостабильности при замене солевых триад на гидрофобные, т.к. известно, что гидрофобные взаимодействия вносят больший вклад в стабильность, образуются на порядок быстрее и «предъявляют» меньше стерических требований [135].

При проведении биоинформатического анализа было установлено, что R в позиции b297 (рис.73), также как и E в позиции b266, консервативны для п/гр 1-3. Единичные исключения встречаются среди морских и почвенных представителей ПА. Для п/гр 4 характерны незаряженные аминокислоты, и, скорее всего, данный регион выполняет иную функцию. Также интересно отметить, что среди ГА в позиции b297 встречается исключительно кислый (D или E) остаток, в то время как в «комплементарной» позиции b266, наоборот, по большей части присутствует положительный R.

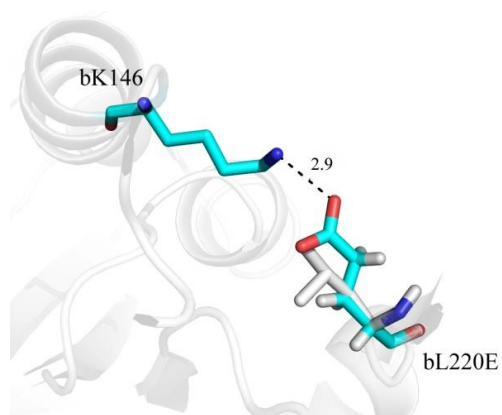
Для установления роли солевой триады bR297-bE266-bN262 (рис.73) в есПА нами была получена мутация bR297A, которая привела к значительному падению термостабильности при практически неизменных кинетических параметрах гидролиза NIPAB (табл. 66).

Таблица 66. Кинетические параметры гидролиза NIPAB и стабильность для есПА ДТ и мутанта bR297A.

Фермент	NIPAB			pH 7; 50°C	pH 10; 25°C
	k_{cat} , с ⁻¹	K_M , μM	k_{cat}/K_M	k_{in} , мин ⁻¹	k_{in} , мин ⁻¹
ДТ	28,0±0,6	23,1±0,8	1,2	$7,2±0,1 \cdot 10^{-4}$	$2,2±0,1 \cdot 10^{-3}$
bR297A	29±1	22,3±0,8	1,3	$5,4±0,4 \cdot 10^{-2}$	$2,1±0,1 \cdot 10^{-2}$

Константа инактивации при 50°C увеличилась более чем в 70 раз, что может свидетельствовать о существенной роли триады в поддержании третичной структуры белка и служить указанием для направленного дизайна стабильности за счет гидрофобизации региона.

3.11.4 Мутация bL220E



Несмотря на низкий энергетический выигрыш от электростатических взаимодействий на поверхности белковой глобулы [134], нами была предложена мутация поверхностного гидрофобного лейцина на заряженный глутамат (рис. 74), с целью во-первых, обеспечить дополнительное электростатическое взаимодействие с лизином, лежащим в основании соседней альфа-спирали

Рисунок 74. Мутант bL220E (синий) в структуре есПА (белый). Структура получена при помощи программы Mutate. (похожая ситуация описана в работе [98], где получили мутант bW431R (см. п.1.2.2.2)), а вторых, удалить неполярный остаток из полярного окружения. Следует отметить, что позиция b220 является группспецифичной и аминокислотный состав в семействе ПА и АГЛА представлен исключительно неполярными остатками.

В данной работе нами была получена мутация bL220E. Стабильность фермента изучали при высокой температуре 50°C и нейтральном рН 7,0. При сравнении с препаратом есПА ДТ не было отмечено сколько-нибудь существенных отличий, что свидетельствует в пользу предположения о низком вкладе поверхностных остатков в стабильность белка.

3.11.5 Мутация *aA173C+bA410C*

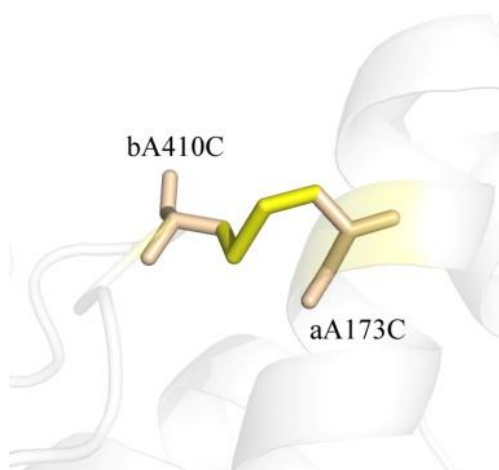


Рисунок 75. Образование дисульфидной связи в модели есПА *aA173C+bA410C*.

В работе [136] предложена оригинальная методика дизайна дисульфидных связей для улучшения стабильности. Основываясь на обобщении предсказаний двух независимых программ для генерации дисульфидных мостиков (DbD [137] и MODIP [138]) в структуре белка, авторы обращают внимание на те позиции, для которых суммарный температурный фактор достигает наибольшего значения. Так из 47 возможных мутантов, предсказанных двумя программами, авторы выбирают 5. И лишь для одного из них наблюдается улучшение стабильности (суммарный В-фактор = 25).

Для есПА программа DbD предсказывает 15 возможных межсубъединичных дисульфидных связей. Руководствуясь принципом наиболее «мягких» структурных замен (замена А на С) и высоким суммарным температурным фактором (В-фактор=27), нами был получен мутант *aA173C+bA410C* (рис. 75). Образование дисульфидной связи подтверждали нативным электрофорезом. При этом фиксировали наличие одной единственной полосы на уровне 86 КДа (данные не представлены).

Стабильность мутанта изучали в условиях сохранения дисульфидной связи при 25°C рН 7,5 и рН 10, а также при 50°C. Однако, не было замечено сколько-нибудь существенного изменения стабильности при выбранных условиях. Данный факт, можно полагать, согласуется со статистикой представленной в работе [136] и еще раз подчеркивает то мнение, что дизайн дисульфидных связей для улучшения стабильности представляет собой довольно тонкий момент, несмотря на довольно существенные указания.

3.11.6 Мутации *bR533C+bW500C, bM485R*

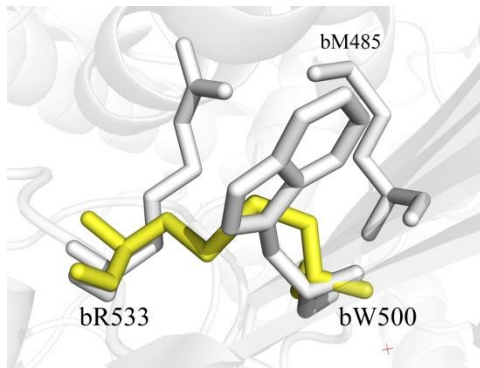


Рисунок 76. Сравнение участка структур есПА (белый) и afПА (желтый).

Еще одним подходом к улучшению стабильности за счет дизайна дисульфидных мостиков является их «копирование» из родственных термостабильных ферментов. Стоит отметить, что в структуре природной есПА нет ни одного цистеина. В то же время в структуре одного из наиболее термостабильных ферментов семейства afПА есть два цистеина, которые, судя по

всему, образуют дисульфидную связь (рис. 76). Эти остатки соответствуют позициям bR533 и bW500 в есПА. По данным биоинформатического анализа эти остатки являются высокогруппспецифичными. В п/гр 1, содержащей есПА, аминокислотный состав распределен таким образом, что встречаются либо пары R,K/W (50%), либо N,S/V (40%). В п/гр 2 (afПА) и 3 (abПА) встречаются исключительно пары C/C. Для п/гр 4 (bm ПА) характерны ароматические остатки F/F, причем для bmПА в данном регионе можно обнаружить целый ароматический кластер bF19-bY485-bF530-bF533 (в соответствии с нумерацией есПА).

Для создания дисульфидного мостика в есПА аналогичного в afПА нами была предложена мутация bR533C+bW500C, а также замена bM485R, компенсирующая удаление заряда, исчезающего при замене bR533C (позиция b485 также является высокогруппспецифичной). Было показано (табл. 67), что одиночные мутанты bR533C, bM485R, а также bR533C+bM485R теряют свою стабильность (активность) уже на стадии культивирования. Мутация bW500C сама по себе приводит к заметной потере стабильности. Тройной мутант также гораздо менее стабилен, чем исходно ДТ. И только при двойной мутации bR533C+bW500C удается получить белок, стабильность которого сравнима с исходной есПА ДТ.

Таблица 67. Кинетические параметры гидролиза NIPAB и стабильность для есПА ДТ и мутантов по остаткам b533, b530, b485.

Фермент	NIPAB			<i>pH</i> 7; 50°C	<i>pH</i> 10; 25°C
	k_{cat} , с ⁻¹	K_M , μМ	k_{cat}/K_M	k_{in} , мин ⁻¹	k_{in} , мин ⁻¹
ДТ	28,0±0,6	23,1±0,8	1,2	7,2±0,1·10 ⁻⁴	2,2±0,1·10 ⁻³
bR533+bW500C	20,6±0,5	18±1	1,1	14,5±1,0·10 ⁻⁴	5,7±0,1·10 ⁻³
bR533+bW500C+bM485R	26,3±0,5	21±1	1,3	3,0±0,2·10 ⁻²	н.д.
bW500C	29,6±0,4	20,7±0,9	1,4	1,9±0,1·10 ⁻²	н.д.
bR533C	н.а.	н.а.	н.а.	н.а.	н.а.
bM485R	н.а.	н.а.	н.а.	н.а.	н.а.
bR533C+bM485R	н.а.	н.а.	н.а.	н.а.	н.а.

Данные факты могут косвенно свидетельствовать об образовании дисульфидной связи или же о более благоприятной геометрии, нежели в одиночных мутантах, что, однако, не приводит к эффекту стабилизации есПА.

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 аминок спирта за счет введения мутации bF71A приводит к 250-кратному увеличению стереоселективности в реакции ацилирования ароматических аминок спиртов.
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 аминок спиртов, а также между эффективностями ацилирования ароматических и алифатических аминок спиртов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chandel A., Rao L., Narasu M., Singh O., Martino S. Di. The realm of penicillin G acylase in β -lactam antibiotics // *Enzyme Microb. Technol.* 2007. Т. 42. С. 199–207.
2. Svedas V.K., Margolin A.L., Berezin I.V. Enzymatic modification of beta-lactam antibiotics: problems and perspectives // *Enzym. Eng. Futur. Dir.* Plenum Press. 1980. С. 257–293.
3. Arroyo M., la Mata I. de, Acebal C., Castellón M.P. Biotechnological applications of penicillin acylases: state-of-the-art. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2003. Т. 60. № 5. С. 507–14.
4. Швядас В.. Ферментативный синтез и модификация бета-лактамных антибиотиков и пептидов. // *Итоги науки и техники. Сер. Биотехнология, ВИНТИ.* 1988. Т. 7. С. 148.
5. Kaufmann W., Bauer K. The production of penicillin amidase by *Escherichia coli* ATCC9637. // *J Gen Microbiol.* 1964. Т. 35. С. 4–5.
6. Vojtisek V., Slezak J. Penicillinamidohydrolase in *Escherichia coli*. III. Catabolite repression, diauxie, effect of cAMP and nature of the enzyme induction. // *Folia Microbiol.* 1975. Т. 20. С. 298–306.
7. Merino E., Balbás P., Recillas F., Becerril B., Valle F., Bolivar F. Carbon regulation and the role in nature of the *Escherichia coli* penicillin acylase (*pac*) gene. // *Mol. Microbiol.* 1992. Т. 6. № 15. С. 2175–82.
8. Valle F., Baibas P., Merino E., Bolivar F. The role of penicillin amidases in nature and in industry. // *Trends Bio- chem Sci.* 1991. Т. 16. С. 36–40.
9. Duggleby H., Tolley S., Hill C., Dodson E., Dodson G., Moody P. Penicillin acylase has a single-amino-acid catalytic centre. // *Nature.* 1995. Т. 373. С. 264–8.
10. Roa A., Castellón M., Goble M., Virden R., García J. New insights on the specificity of penicillin acylase // *Biochem Biophys Res Commun.* 1995. Т. 206. С. 629–36.
11. Sakaguchi K., Murao S. A preliminary report on a new enzyme, “penicillin-amidase” // *J. Agric. Chem. Soc. Jpn.* 1950. Т. 23. С. 411.
12. Warburton D., Balasingham K., Dunnill P., Lilly M. The preparation and kinetics of immobilised penicillin amidase from *Escherichia coli*. // *Biochim Biophys Acta.* 1972. Т. 284. № 1. С. 278–284.
13. Balasingham K., Warburton D., Dunnill P., Lilly M. The isolation and kinetics of penicillin amidase from *Escherichia coli* // *Biochim Biophys Acta.* 1972. Т. 276. № 1. С. 250–256.
14. Rolinson G.N., Batchelor F.R., Butterworth D., Cameron-Wood J., Cole M., Eustace G.C., Marian V., Richards M., Chain E.B. Formation of 6-aminopenicillanic acid from penicillin by enzymic hydrolysis // *Nature.* 1960. Т. 187. С. 236–7.

15. Kaufmann W., Bauer K. Enzymatic cleavage and resynthesis of penicillins // *Naturwissenschaften*. 1960. Т. 47. С. 474–475.
16. Svedas V.K., Margolin A.L., Berezin I.V. Enzymatic synthesis of beta-lactam antibiotics: a thermodynamic background. // *Enzyme.Microb.Technol.* 1980. Т. 2. С. 138–144.
17. Deshpande B.S., Ambedkar S.S., Sudhakaran V.K., Shewale J.G. Molecular biology of beta-lactam acylases // *J. Microbiol. Biotechnol.* 1994. Т. 10. С. 129–138.
18. Svedas V., Savchenko M., Beltser A., Guranda D. Enantioselective Penicillin Acylase-catalyzed Reactions // *Ann. New York Acad. Sci.* 1996. Т. 799. С. 659–669.
19. Cole M. Properties of the penicillin deacylase enzyme of *Escherichia coli* // *Nature*. 1964. Т. 203.
20. Margolin A., Svedas V., Berezin I. Substrate specificity of penicillin amidase from *E. coli*. // *Biochim Biophys Acta*. 1980. Т. 616. № 2. С. 283–9.
21. Гуранда Д. Субстратная специфичность и стереоспецифичность пенициллинацилаз из *Escherichia coli* и *Alcaligenes faecalis* // Кандидатская диссертация, Москва. 2000.
22. Юшко М.Ю., Шамолина Т.А., Гуранда Д.Ф., Синев А.В., Швядас В.К. Высокоспецифичные субстраты для спектрофотометрического определения активности пенициллинацилазы. // *Биохимия*. 1998. Т. 63. № 9. С. 1295–1300.
23. Soloshonok V.A., Soloshonok I.V., Kukhar V.P., Svedas V.K. Biomimetic transamination of α -alkyl- β -keto carboxylic esters. Chemo-enzymatic approach to the stereochemically defined α -alkyl- β -fluoroalkyl- β -amino acids // *J. Org. Chem.* 1998. Т. 63. № 6. С. 1878–1884.
24. Galunsky B., Lummer K., Volker Kasche A. Comparative Study of Substrate- and Stereospecificity of Penicillin G Amidases from Different Sources and Hybrid Isoenzymes // 2000. Т. 632. С. 623–632.
25. Cole M. Factors affecting the synthesis of ampicillin and hydroxympenicillins by the cell-bound penicillin acylase of *Escherichia coli*. // *Biochem. J.* 1969. Т. 115. № 4. С. 757–64.
26. Березин И.В., Клесов А.А., Марголин А.Л., Ныс П.С., Савицкая Е.М., Швядас В.К. Изучение пенициллинацилазы из *E.coli*. рН-Зависимость константы равновесия ферментативного гидролиза бензилпенициллина // *Антибиотики*. 1976. Т. 21. № 6. С. 519–523.
27. Клесов А.А., Марголин А.Л., Швядас В.К. Ферментативный синтез антибиотиков. Перенос ацильной группы на 6-аминопенициллиновую кислоту, катализируемый пенициллинамидазой из *E.coli* // *Биорг. химия*. 1977. Т. 3. С. 654–662.
28. Березин И.В., Марголин А.Л., Швядас В.К. Исследование реакции гидролиза-синтеза цефалотина, катализируемой пенициллинамидазой. // *Докл. АН СССР*. 1977. Т. 235. С. 961–964.

29. Svedas V.K., Margolin A.L., Borisov I.L., Berezin I.V. Kinetics of the enzymatic synthesis of benzylpenicillin. // *Enzyme.Microb.Technol.* 1980. T. 2. C. 313–317.
30. DSM. A new standard in antibiotics // DSM Press Release, Delft. 2004.
31. Fernandez-Lafuente R., Alvaro G., Blanco R.M., and Guisan J.M. Equilibrium controlled synthesis of cephalothin in cosolvent water systems by stabilized penicillin G acylase // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1991. T. 27. C. 277–290.
32. Gololobov M.Y., Borisov I.L., Švedas V.K. Acyl group transfer by proteases forming an acylenzyme intermediate: kinetic model analysis (including hydrolysis of acylenzyme-nucleophile complex) // *J. Theor. Biol.* 1989. T. 140. C. 193–204.
33. Gololobov M.Y., Borisov I.L., Belikov V.M., Svedas V.K. Acyl group transfer by proteases forming an acylenzyme intermediate. Kinetic model analysis. // *Biotechnol. Bioeng.* 1988. T. 32. № 7. C. 866–872.
34. Youshko M.I., Chilov G.G., Shcherbakova T.A., Svedas V.K. Quantitative characterization of the nucleophile reactivity in penicillin acylase-catalyzed acyl transfer reactions // *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteomics.* 2002. T. 1599. № 1-2. C. 134–140.
35. Youshko M.I., Svedas V.K. Penicillin acylase-catalyzed solid-state ampicillin synthesis // *Adv. Synth. Catal.* 2002. T. 344. № 8.
36. Youshko M.I., Moody H.M., Bukhanov A.L., Boosten W.H., Svedas V.K. Penicillin acylase-catalyzed synthesis of β -lactam antibiotics in highly condensed aqueous systems: beneficial impact of kinetic substrate supersaturation // *Biotechnol. Bioeng.* 2004. T. 85. C. 3.
37. Юшко М.И. Кинетические закономерности ферментативного синтеза ампициллина, катализируемого пенициллинацилазой, в гомогенных, гетерогенных и твердофазных системах. // Кандидатская диссертация, Москва. 2000.
38. Youshko M.I., VanLangen L.M., DeVroom E., VanRantwijk F., Sheldon R.A., Švedas V.K. Penicillin Acylase-Catalyzed Ampicillin Synthesis Employing a pH Gradient: a New Approach to Optimization // *Biotechnol. Bioeng.* 2002. T. 78. № 5. C. 589–593.
39. Youshko M.I., VanLangen L.M., DeVroom E., VanRantwijk F., Sheldon R.A., Švedas V.K. Highly efficient synthesis of ampicillin in an “aqueous solution-precipitate” system. Repetitive addition of substrates in a semi-continuous process. // *Biotechnol. Bioeng.* 2001. T. 73. C. 426–430.
40. Fernandez-Lafuente R., Rossel C.M., Guisan J.M. Enzyme reaction engineering: synthesis of antibiotics catalysed by penicillin G acylase in the presence of organic cosolvents // *Enzyme Microb. Technol.* 1991. T. 13. C. 898–905.
41. Diender M.B., Straathof A.J.J., Heijnen J.J. Predicting enzyme catalyzed reaction equilibria in cosolvent-water mixtures as a function of pH and solvent composition // *Biocatal. Biotransform.* 1998. T. 16. C. 275–289.

42. Hyun C.K., Kim J.H., Kim Y.J. Effect of water activity on enzymatic synthesis of cephalixin // *Biotechnol. Lett.* 1989. Т. 11. С. 537–540.
43. Hyun C.K., Kim J.H., Ryu D.D.Y. Enhancement effect of water activity on enzymatic synthesis of cephalixin // *Biotechnol. Bioeng.* 1993. Т. 42. С. 800–806.
44. Kim M.G., Lee S.B. Penicillin acylase-catalyzed synthesis of beta-lactam antibiotics in water-methanol mixtures: effect of cosolvent content and chemical nature of substrate on reaction rates and yields // *J. Mol. Catal. B. Enzym.* 1996. Т. 1. С. 201–211.
45. Семенов А.Н., Мартинек К., Швядас В., Марголин А., Березин И. Ферментативный синтез бензилпенициллина в двухфазной водноорганической системе // *Докл. АН СССР.* 1981. Т. 258. № 5. С. 1124–1126.
46. Guranda D., VanLangen L., VanRantwijk F., Sheldon R., Švedas V. Highly efficient and enantioselective enzymatic acylation of amines in aqueous medium // *Tetrahedron: Asymmetry.* 2001. Т. 12. № 11. С. 1645–1650.
47. Gutman A.L., Meyer E., Kalerin E., Polyak F., Sterling J. Enzymatic resolution of racemic amines in a continuous reactor in organic solvents // *Biotechnol. Bioeng.* 1992. Т. 40. С. 760–767.
48. Ямскова О. Свойства мутантов пенициллинацилазы из *Escherichia coli* по положению 145 и 149 альфа субъединицы, 71, 384, 385 бета субъединицы в реакциях ацилирования аминокосоединений и стереоселективного гидролиза амидов // *Кандидатская диссертация, Москва.* 2011.
49. 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. Т. 348. № 4. С. 999–1014.
50. Hewitt L., Kasche V., Lummer K., Lewis R., Murshudov G., Verma C., Dodson G., Wilson K. Structure of a slow processing precursor penicillin acylase from *Escherichia coli* reveals the linker peptide blocking the active-site cleft. // *J Mol Biol.* 2000. Т. 302. № 4. С. 887–98.
51. Швядас В.К., Марголин А.Л., Шерстюк С.Ф., Березин И.В. Инактивация растворимой и иммобилизованной пенициллинамидазы из *E.coli* под действием фенилметилсульфонилфторида: кинетический анализ и титрование активных центров. // *Биорг. Химия.* 1977. Т. 3. С. 546–554.
52. 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. Т. 378. № 6555. С. 416–9.
53. Чилов Г.Г., Сидорова А.В., Швядас В.К. Исследование механизма каталитического действия N-концевых гидролаз методами квантово-химического моделирования // *Биохимия.* 2007. Т. 72. С. 615–21.

54. Grigorenko B.L., Khrenova M.G., Nilov D.K., Nemukhin A.V., Svedas V.K. Catalytic Cycle of Penicillin Acylase from *Escherichia coli*: QM/MM Modeling of Chemical Transformations in the Enzyme Active Site upon Penicillin G Hydrolysis. // *ACS Catal.* 2014. T. 4. C. 2521–2529.
55. Done S.H., Brannigan J.A., Moody P.C., Hubbard R.. Ligand-induced conformational change in penicillin acylase // *J. Mol. Biol.* 1998. T. 284. C. 463–75.
56. 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. T. 313. № 1. C. 139–50.
57. Строганов О.В. Изучение субстратной специфичности пенициллинацилазы методами молекулярного моделирования // Кандидатская диссертация, Москва. 2007.
58. Alkema W.B., Hensgens C.M., Kroezinga E.H., DeVries E., Floris R., VanderLaan 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. T. 13. № 12. C. 857–63.
59. Alkema W., Prins A., DeVries E., Janssen D. Role of alphaArg145 and betaArg263 in the active site of penicillin acylase of *Escherichia coli*. // *Biochem. J.* 2002. T. 365. C. 303–309.
60. Novikov F., Stroganov O., Khaliullin I., Panin N., Shapovalova I., Chilov G., Svedas V. Molecular modeling of different substrate binding modes and their role in penicillin acylase catalysis. // *FEBS J.* 2013. № 280. C. 115–126.
61. Kaplan O., Bezouška K., Malandra A., Veselá A., Petříčková A., Felsberg J., Rinágelová A., Křen V., Martínková L. Genome mining for the discovery of new nitrilases in filamentous fungi. // *Biotechnol Lett.* 2011. T. 33. № 2. C. 309–12.
62. Fechter M.H., Griengl H. Hydroxynitrile Lyases: Biological Sources and Application as Biocatalysts // 2004. T. 42. № 4. C. 287–294.
63. Streit W.R., Daniel R. *Metagenomics* // Springer Protoc. Humana Press. New York. 2010.
64. Uchiyama T., Miyazaki K. Functional metagenomics for enzyme discovery: challenges to efficient screening. // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2009. T. 20. № 6. C. 616–22.
65. Gabor E.M., DeVries E.J., Janssen D.B. A novel penicillin acylase from the environmental gene pool with improved synthetic properties // *Enzyme Microb. Technol.* 2005. T. 36. № 2-3. C. 182–190.
66. <http://ru.wikipedia.org/wiki/Rosetta@home>.
67. Hanson C.V., Nishiyama Y., Paul S. Catalytic antibodies and their applications. // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2005. T. 16. № 6. C. 631–6.

68. Tanaka F. Catalytic antibodies as designer proteases and esterases. // *Chem. Rev.* 2002. T. 102. № 12. C. 4885–906.
69. Gabor E.M., Janssen D.B. Increasing the synthetic performance of penicillin acylase PAS2 by structure-inspired semi-random mutagenesis. // *Protein Eng. Des. Sel.* 2004. T. 17. № 7. C. 571–9.
70. Škrob F., Bečka S., Plháčková K., Fotopulosová V., Kyslík P. Novel penicillin G acylase from *Achromobacter* sp. CCM 4824 // *Enzyme Microb. Technol.* 2003. T. 32. № 6. C. 738–744.
71. Barends T.R.M., Polderman-Tijmes J.J., Jekel P.A., Williams C., Wybenga G., Janssen D.B., Dijkstra B.W. *Acetobacter turbidans* alpha-amino acid ester hydrolase: how a single mutation improves an antibiotic-producing enzyme. // *J. Biol. Chem.* 2006. T. 281. № 9. C. 5804–10.
72. Torres-Guzmán R., de la Mata I., Torres-Bacete J., Arroyo M., Castellón M.P., Acebal C. Substrate specificity of penicillin acylase from *Streptomyces lavendulae*. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002. T. 291. № 3. C. 593–7.
73. 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. T. 38. № 1. C. 24–8.
74. Chiang C., Bennett R.E. Purification and properties of penicillin amidase from *Bacillus megaterium*. // *J. Bacteriol.* 1967. T. 93. № 1. C. 302–8.
75. Jager S., Jekel P., Janssen D. Hybrid penicillin acylases with improved properties for synthesis of β -lactam antibiotics // *Enzyme Microb. Technol.* 2007. T. 40. № 5. C. 1335–1344.
76. 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 cephalexin. // *Protein Expr. Purif.* 2006. T. 46. № 1. C. 107–13.
77. Verhaert R.M., Riemens A.M., VanderLaan J.M., VanDuin J., Quax W.J. Molecular cloning and analysis of the gene encoding the thermostable penicillin G acylase from *Alcaligenes faecalis*. // *Appl. Environ. Microbiol.* 1997. T. 63. № 9. C. 3412–8.
78. Svedas V., Guranda D., VanLangen L., VanRantwijk F., Sheldon R. Kinetic study of penicillin acylase from *Alcaligenes faecalis*. // *FEBS Lett.* 1997. T. 417. № 3. C. 414–8.
79. 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 // 2004. T. 70. № 5. C. 2764–2770.
80. 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. T. 11. C. 105.
81. Prieto I., Martín J., Arche R., Fern P., Prez-aranda A., I J.L.B. Penicillin acylase mutants with altered site-directed activity from *Kluyvera citrophila* // *Appl. Microbiol.* 1990. C. 553–559.

82. 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. T. 74. № 5. C. 1023–30.
83. Forney L.J., Wong D.C. Alteration of the catalytic efficiency of penicillin amidase from *Escherichia coli*. // *Appl. Environ. Microbiol.* 1989. T. 55. № 10. C. 2556–60.
84. Roa A., Garcia J.L., Salto F., Cortes E. Changing the substrate specificity of penicillin G acylase from *Kluyvera citrophila* through selective pressure. // *Biochem. J.* 1994. T. 303. C. 869–75.
85. Niersbach H., Kohne A., Tischer W., Weber M., Wedekind F., Plapp R. Improvement of the catalytic properties of penicillin G acylase from *Escherichia coli* ATCC 11105 by selection of a new substrate specificity // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1995. T. 43. № 4. C. 679–684.
86. Zhou Z., Zhang A., Wang J., Chen M., Li R., Yang S., Yuan Z. Improving the Specific Synthetic Activity of a Penicillin G Acylase Using DNA Family Shuffling // *Acta Biochim. Biophys. Sin.* (Shanghai). 2003. T. 35. № 6. C. 573–579.
87. Flores G., Soberón X., Osuna J. Production of a fully functional , permuted single-chain penicillin G acylase // *Protein Sci.* 2004. T. 13. C. 1677–1683.
88. Oliver G., Valle F., Rosetti F., Gómez-Pedrozo M., Santamaría P., Gosset G., Bolivar F. A common precursor for the two subunits of the penicillin acylase from *Escherichia coli* ATCC11105. // *Gene.* 1985. T. 40. № 1. C. 9–14.
89. Williams J., Zuzel T. Penicillin G acylase (E.C.3.4.1.11) substrate specificity modification by in vitro mutagenesis // *J Cell Biochem.* 1985. № 9B. C. 99.
90. Martín J., Prieto I., Barbero J.L., Pérez-Gil J., Mancheño J.M., Arche R. Thermodynamic profiles of penicillin G hydrolysis catalyzed by wild-type and Met->Ala168 mutant penicillin acylases from *Kluyvera citrophila*. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1990. T. 1037. № 2. C. 133–9.
91. Jager S., Shapovalova I. V, Jekel P. a, Alkema W.B.L., Svedas V.K., Janssen D.B. Saturation mutagenesis reveals the importance of residues alphaR145 and alphaF146 of penicillin acylase in the synthesis of beta-lactam antibiotics. // *J. Biotechnol.* 2008. T. 133. № 1. C. 18–26.
92. Alkema W.B., Dijkhuis A.J., Vries E. de, Janssen D.B. The role of hydrophobic active-site residues in substrate specificity and acyl transfer activity of penicillin acylase // *Eur. J. Biochem.* 2002. T. 269. № 8. C. 2093–2100.
93. Alkema W.B., Hensgens C.M., Snijder H.J., Keizer E., Dijkstra B.W., Janssen D.B. Structural and kinetic studies on ligand binding in wild-type and active-site mutants of penicillin acylase. // *Protein Eng. Des. Sel.* 2004. T. 17. № 5. C. 473–80.
94. 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. T. 25. № 3. C. 135–44.

95. Morillas M., Vey C.E.M.C., Brannigan J.A., Ladurner A.G., Forney L.J., Virden R. Mutations of penicillin acylase residue B71 extend substrate specificity by decreasing steric constraints for substrate binding // *Biochem. J.* 2003. Т. 150. С. 143–150.
96. Шаповалова И.В., Алкема В.Б.Л., Ямскова О.В., де Врис Э., Гуранда Д.Ф., Янссен Д.Б., Швядас В.К. Мутация остатка bF71 в структуре пенициллинацилазы из *Escherichia coli* приводит к улучшению энантиоселективности и каталитических свойств // *Acta Naturae.* 2009. Т. 3. С. 65–70.
97. Шаповалова И.В. Характеристика новых мутантных форм пенициллинацилазы из *Escherichia coli* // Кандидатская диссертация, Москва. 2007.
98. DelRio G., Soberon X. An Engineered Penicillin Acylase with Altered Surface Charge Is More Stable in Alkaline pH // *Ann. New York Acad. Sci.* 1996. № 799. С. 61–64.
99. Yang S., Zhou L., Tang H., Pan J., Wu X., Huang H., Yuan Z. Rational design of a more stable penicillin G acylase against organic cosolvent // *J. Mol. Catal. B Enzym.* 2002. Т. 18. № 4-6. С. 285–290.
100. Yuryev R., Kasche V., Ignatova Z., Galunsky B. Improved *A. faecalis* penicillin amidase mutant retains the thermodynamic and pH stability of the wild type enzyme. // *Protein J.* 2010. Т. 29. № 3. С. 181–7.
101. Oh B., Kim K., Park J., Yoon J., Han D., Kim Y. Modifying the substrate specificity of penicillin G acylase to cephalosporin acylase by mutating residues “active site” // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004. Т. 319. С. 486–492.
102. Guncheva M., Ivanov I., Galunsky B., Stambolieva N., Kaneti J. Kinetic studies and molecular modelling attribute a crucial role in the specificity and stereoselectivity of penicillin acylase to the pair ArgA145-ArgB263. // *Eur. J. Biochem.* 2004. Т. 271. № 11. С. 2272–9.
103. Polizzi K.M., Chaparro-Riggers J.F., Vazquez-Figueroa E., Bommarius A.S. Structure-guided consensus approach to create a more thermostable penicillin G acylase. // *Biotechnol. J.* 2006. Т. 1. № 5. С. 531–6.
104. Serra I., Cecchini D.A., Ubiali D., Manazza E.M., Albertini A.M., Terreni M. Coupling of Site-Directed Mutagenesis and Immobilization for the Rational Design of More Efficient Biocatalysts : The Case of Immobilized 3G3K PGA from *E. coli* // *European J. Org. Chem.* 2009. С. 1384–1389.
105. 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 Improvement of Catalytic Properties of *Escherichia coli* Penicillin G Acylase Immobilized on Glyoxyl Agarose by // *Appl. Environ. Microbiol.* 2005. Т. 71. № 12. С. 8937–40.
106. Cecchini D., Pavesi R., Sanna S., Daly S., Xaiz R., Pregolato 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.

107. Smith G.P., Petrenko V. Phage Display // *Chem. Rev.* 1997. Т. 97. № 2. С. 391–410.
108. Shi Y.-F., Soumillion P., Ueda M. Effects of catalytic site mutations on active expression of phage fused penicillin acylase. // *J. Biotechnol.* 2010. Т. 145. № 2. С. 139–42.
109. Stratagene. QuikChange ® Site-Directed Mutagenesis Kit // *Mutagenesis.* 2010. С. 1–18.
110. Dominy C.N., Andrews D.W. Site-directed mutagenesis by inverse PCR. // *Methods Mol. Biol.* 2003. Т. 235. С. 209–23.
111. Ясная А. Клонирование и экспрессия в *E.coli* пенициллинацилаз для получения мутантных форм с улучшенными свойствами // Кандидатская диссертация, Москва. 2009.
112. An Y., Ji J., Wu W., Lv A., Huang R., Wei Y. A rapid and efficient method for multiple-site mutagenesis with a modified overlap extension PCR. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2005. Т. 68. № 6. С. 774–8.
113. <http://products.invitrogen.com/ivgn/product/S33102>.
114. Keilmann C., Wanner G., Böck A. Molecular basis of the exclusive low-temperature synthesis of an enzyme in *E. coli*: penicillin acylase. // *Biol Chem Hoppe Seyler.* 1993. Т. 374. С. 983–92.
115. Rajendhran J., Gunasekaran P. Recent biotechnological interventions for developing improved penicillin G acylases. // *J. Biosci. Bioeng.* 2004. Т. 97. № 1. С. 1–13.
116. Lindsay C., Pain R. The folding and solution conformation of penicillin G acylase // *Eur. J. Biochem.* 1990. Т. 192. С. 133–141.
117. Lumry R., Eyring H. Conformational changes of proteins // *J. Phys. Chem.* 1954. Т. 58. С. 110–120.
118. Balwant S. 3-Acyl-4-ethyl-2-oxazolones and oxazolidinones // US4150030. 1979.
119. Alberto S. Optical resolution of DL-3-acetylthio-2-methylpropionic acid using L-(+)-2-aminobutanol as resolving agent // US5367091. 1994.
120. Scott D. Phenylalaninol derivatives for the treatment of central nervous system disorders // WO9817636. 1998.
121. Sidduri Achytharao. Phenylalaninol derivatives // HK1043589. 2005.
122. Ming G. Process for preparing r-Gossypol l-phenylalaninol dienamine // WO200904541. 2009.
123. Chernobrovkin M.G., Shapovalova E.N., Guranda D.T., Kudryavtsev P., Svedas V.K., Shpigun O. Chiral high-performance liquid chromatography analysis of alpha-amino acid mixtures using a novel SH reagent--N-R-mandelyl-L-cysteine and traditional enantiomeric thiols for precolumn derivatization. // *J. Chromatogr. A.* 2007. Т. 1175. № 1. С. 89–95.

124. Oinonen C., Rouvinen J. Structural comparison of Ntn-hydrolases. // *Protein Sci.* 2000. Т. 9. № 12. С. 2329–37.
125. Варфоломеев С.Д. Химическая энзимология // Издательский центр “Академия.” 2005.
126. Arad G., Chorev M., Shtorch a, Goldblum a, Kotler M. Point mutation in avian sarcoma leukaemia virus protease which increases its activity but impairs infectious virus production. // *J. Gen. Virol.* 1995. Т. 76 (Pt 8). С. 1917–25.
127. Choi K.S., Kim J. a, Kang H.S. Effects of site-directed mutations on processing and activities of penicillin G acylase from *Escherichia coli* ATCC 11105. // *J. Bacteriol.* 1992. Т. 174. № 19. С. 6270–6.
128. Zhang Y.-W., Liu R.-J., Xu X.-M. One-pot, two-step enzymatic synthesis of amoxicillin by complexing with Zn²⁺. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2010. Т. 88. № 1. С. 49–55.
129. Kemperman G.J. Clathrate Type Complexation of Cephalosporin Antibiotics // PhD thesis, Radboud Univ. Nijmegen. 2001.
130. Гуранда Д., Ямскова О., Панин Н., Швядас В. Способ улучшения каталитических свойств пенициллинацилазы // Заявка на изобретение № 2009142994 от 23.11.2009. Заявитель “Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова.” 2009.
131. Суплатов Д.А. Роль структурных факторов в активности и стабильности бактериальных пенициллинацилаз // Оглавление // *Дипломная работа.* 2007.
132. Suplatov D., Panin N., Kirilin E., Shcherbakova T., Kudryavtsev P., Švedas V. 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.
133. Щербакова Т., Панин Н., Гуранда Д., Швядас В. Способ синтеза пептидов, в том числе бета-лактамовых 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.
134. Horovitz A., Serrano L., Avron B., Bycroft M., Fersht A.R. Strength and co-operativity of contributions of surface salt bridges to protein stability. // 1990. Т. 6. С. 1031–1044.
135. Waldburger C., Schildbach J., Sauer R. Are buried salt bridges important for protein stability and conformational specificity? // *Nat Struct Biol.* 1995. Т. 2. № 2. С. 122–8.
136. Le Q.A.T., Joo J.C., Yoo Y.J., Kim Y.H. Development of thermostable *Candida antarctica* lipase B through novel in silico design of disulfide bridge. // *Biotechnol. Bioeng.* 2012. Т. 109. № 4. С. 867–76.
137. <http://cptweb.cpt.wayne.edu/DbD2/>.
138. <http://caps.ncbs.res.in/dsdbase/modip.html>.

139. <http://biokinet.belozersky.msu.ru/zebra>.
140. <http://www.rcsb.org/>.
141. Davis I.W., Baker D. RosettaLigand docking with full ligand and receptor flexibility. // *J. Mol. Biol.* 2009. T. 385. № 2. C. 381–92.
142. Krieger E., Nabuurs S., Vriend G. Homology modeling // *Struct. Bioinforma.* 2003. C. 507–521.
143. Krieger E., Vriend G. Increasing the Precision of Comparative Models with YASARA NOVA — a Self-Parameterizing Force Field // 2002. T. 402. № September 2001. C. 393–402.
144. Georgescu R., Bandara G., Sun L. Saturation mutagenesis. // *Methods Mol. Biol.* 2003. T. 231. C. 75–83.
145. Reetz M.T., Wang L.-W., Bocola M. Directed evolution of enantioselective enzymes: iterative cycles of CASTing for probing protein-sequence space. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2006. T. 45. № 8. C. 1236–41.
146. Reetz M.T., Bocola M., Carballeira J.D., Zha D., Vogel A. Expanding the range of substrate acceptance of enzymes: combinatorial active-site saturation test. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2005. T. 44. № 27. C. 4192–6.
147. Fox R.J., Davis S.C., Mundorff E.C., Newman L.M., Gavrilovic V., Ma S.K., Chung L.M., Ching C., Tam S., Muley S., Grate J., Gruber J., Whitman J.C., Sheldon R. a, Huisman G.W. Improving catalytic function by ProSAR-driven enzyme evolution. // *Nat. Biotechnol.* 2007. T. 25. № 3. C. 338–44.
148. Lehmann M., Loch C., Middendorf A., Studer D., Lassen S.F., Pasamontes L., Loon A.P.G.M. van, Wyss M. The consensus concept for thermostability engineering of proteins: further proof of concept. // *Protein Eng.* 2002. T. 15. № 5. C. 403–11.
149. Kuipers R.K., Joosten H.-J., Berkel W.J.H. van, Leferink N.G.H., Rooijen E., Ittmann E., Zimmeren F. van, Jochens H., Bornscheuer U., Vriend G., Santos V. a P.M. dos, Schaap P.J. 3DM: systematic analysis of heterogeneous superfamily data to discover protein functionalities. // *Proteins.* 2010. T. 78. № 9. C. 2101–13.
150. Stemmer W.P.C. Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling // *Nature.* 1994. T. 370. C. 389–91.
151. Cadwell R.C., Joyce G.F. Randomization of genes by PCR mutagenesis. // *Genome Res.* 1992. T. 2. № 1. C. 28–33.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1: «Парное выравнивание первичных аминокислотных последовательностей ПА»

1.1 Выравнивание последовательностей есПА и ксПА (85%)

	сигнальный пептид	а-цепь	
sp ATCC11105 ecPA	MKNRNRMIVNCVTSASLMYYWSLPAALAEQSSSEIKIVRDEYGMPIHYANDTWHLFYGYGYV		60
sp ATCC21285 kcPA	MKNRNRMIVNGIVTSLICCSLSALAAASPTEVKIVRDEYGMPIHYADDTYRLFYGYGYV		60
***** :.:***: **:* * :.:*****:*****:*****			
sp ATCC11105 ecPA	VAQDRLFQMEMARRSTQGTVAEVLGKDFVKFDKDIRRNYWPDairaQIAALSPEdMSILQ		120
sp ATCC21285 kcPA	VAQDRLFQMEMARRSTQGTVSEVLGKAFVSVFDKDIRQNYWPDsIRAQIASLSAEDKsILQ		120
*****:*****:*_******:*****:*****:*_*_******			
sp ATCC11105 ecPA	GYADGMNAWIDKVTNPNETLLPKQFNTFGFTPKRWEPPFDVAMIFVGTMANRFSdSTSEID		180
sp ATCC21285 kcPA	GYADGMNAWIDKVNAsPDKLLPQQFSTFGFKPKHWEPPFDVAMIFVGTMANRFSdSTSEID		180
*****:*_*_******:*****:*_******:*****:*****			
sp ATCC11105 ecPA	NLALLTALKDKYGVsQGMVFNQLKWLVNPSAPTTIAVQESNYPLKFNQNSQTAALLP-	спейсер	239
sp ATCC21285 kcPA	NLALLTAVKDKYGNDEGMVFNQLKWLVNPSAPTTIAARESSYPLKFDLQNTQTAAALLVP		240
*****:*****:_:*****:*****:*****:*****:*****			
sp ATCC11105 ecPA	RYDLPApMLDRPAKGAAGALLALTAGKNREtIAAQFAGGANGLAGYPTTSNMWVIGKSK	b-цепь	299
sp ATCC21285 kcPA	RYDQpAPMLDRPAKGTdGALLAVTAIKNREtIAAQFANG-ANGLAGYPTTSNMWVIGKNK		299
*** *****:*****:*_* *****:*****:*****_*			
sp ATCC11105 ecPA	AQDAKAImVNGPQFGWYAPAYTYGIGLHGAGYDVTGNTPFAYPGLVFGHNGVISWGStAG		359
sp ATCC21285 kcPA	AQDAKAImVNGPQFGWYAPAYTYGIGLHGAGYDVTGNTPFAYPGLVFGHNGtISWGStAG		359
*****:*****:*****:*****:*****_*			
sp ATCC11105 ecPA	FGDDVDIFAErLSAEKPGYLLHNGKwVKMLsREETITVKNGQAEtFTVWRtVHGNIlQTD		419
sp ATCC21285 kcPA	FGDDVDIFAEKLSAEKPGYyQHNGEWVKMLsRKETIAVKdGQPEtFTVWRtLDGNVikTD		419
*****:*****_*_*_******:*****:*****:*****_*_*_******			
sp ATCC11105 ecPA	QTTQTAYAKsRAWdGKEVASLLAWThQMKAKNWQEWtQQAAKQALtINWYyADVNGNIgY		479
sp ATCC21285 kcPA	TRtQTAYAKARAWAGKEVASLLAWThQMKAKNWPEWtQQAAKQALtINWYyADVNGNIgY		479
*****:*** *****:*****:*****:*****:*****			
sp ATCC11105 ecPA	VHTGAYPDRQSGHDPrLPVPGtGKWDWkGLLPfEMNPkVYNPQSGYIANWNNsPQKdYpA		539
sp ATCC21285 kcPA	VHTGAYPDRQPghDPrLPVp-DGkWDWkGLLSFDLNPKVYNPQSGYIANWNNsPQKdYpA		538
*****_* *****_*_*_******:*****_*_*_******			
sp ATCC11105 ecPA	SDLFAFLWGGADRVTEIDrLLEQKPrLTADQAWdVIRQTSRQDLNLRlFLPtlQAATsGL		599
sp ATCC21285 kcPA	SDLFAFLWGGADRVTEIDtILDkQPrFTADQAWdVIRQTSLRDL-LRlFLpALKdATANL		597
*****:*****_*_*_******:*****_*_*_******:*****_*_*_******			
sp ATCC11105 ecPA	TQSDPrRQLVETLrRWdGINLLNDdGKTWQQPGSAILNVWlTSMlKRTVVAAVPMPFDKw		659
sp ATCC21285 kcPA	AENDPrRQLVdKLASWdGENLVNDdGkTYQQPGSAILNAWlTSMlKRTVVAAVPAPFGKw		657
:.:*****_*_*_* ** **:*_******:*****:*****_*_*_*			
sp ATCC11105 ecPA	YSASGYETtQdGPTGSlnISVgAKILYEAVQGDkSPiPQAVDLFAGKpQQEVVLAALEdT		719
sp ATCC21285 kcPA	YSASGYETtQdGPTGSlnISVgAKILYEAALQGDkSPiPQAVDLFGGKPEQEVILAALDDA		717
*****:*****:*****:*****_*_*_******:*****_*_*_******			
sp ATCC11105 ecPA	WETLSKRYGNVSNWKTpAMALtFRANNfFGVPQAAAEtRHQAEYQNRGTENDMIVFSP		779
sp ATCC21285 kcPA	WQTLsKRYGNdVtGkTpAMALtFRANNfFGVPQAAAKEARHQAEYQNRGTENDMIVFSP		777
*_*_******:*****_*_*_******:*****_*_*_******:*****_*_*_******			
sp ATCC11105 ecPA	TTSDrPVLAWDVVApGQSGFIAPdGtVDkHYEDQLKMYESfGRKSLWlTKQDVdEAHKESQ		839
sp ATCC21285 kcPA	TSGNrPVLAWDVVApGQSGFIAPdGkADkHYDDQLKMYESfGRKSLWlTtPQDVdEHKESQ		837
*_*_******:*****_*_*_******_*_*_******_*_*_******_*_*_******			
sp ATCC11105 ecPA	EVLHVQR	846	
sp ATCC21285 kcPA	EVLQVQR	844	
:			

1.3 Выравнивание последовательностей ecPA и axPA (51%)

```

sp|ATCC11105|ecPA      MKNRRNMIVNCVTASLMYYWSLPALAEQSSSEIKIVRDEYGMPHIYANDTWHLFYGYGV 60
sp|AAP20806|axPA      -----

sp|ATCC11105|ecPA      VAQDRLFQMEMARRSTQGTVAEVLGKDFVKFDKDIRRNYWPDAIRAQIAALSPEDMSILQ 120
sp|AAP20806|axPA      -----SMVAFDKSIRGNFSPERIQRQLAALPAADRQVLD 34
                        .:* **.* ** * : * : * :***** * :*:

sp|ATCC11105|ecPA      GYADGMNAWIDKVNINPETLLPKQFNTFGFTPKRWEFPDVAMIFVGTMANRFSDESTSEID 180
sp|AAP20806|axPA      GYAAGMNAWLARIRAQPGQLMPKEFNDLGFAPADWTAYDVAMIFIGTMANRFS DANSEID 94
                        *** *****: :.:.* *:*:* ** * :*****:*****:*****

sp|ATCC11105|ecPA      NLALLTALKDKYGVSQGMVFNQLKWLVNPSAPTTIAVQESNYPLKFNQQN--SQTAALL 238
sp|AAP20806|axPA      NLALLTALKDRHGEAEAMRIFNQLRWLTD SRAPTTVPPQEGSYQPAVFQPEGAEQLAYAL 154
                        *****:.* :.: * :****:*:.. *****: **..* . * : . * * *

sp|ATCC11105|ecPA      PRYDLPA PMLDRPAKG-ADGALLALTAGKNRETIAAQFAQGGANGLAGYPTT SNMWVIGK 297
sp|AAP20806|axPA      PRYDGT PMLERVVRDPATRGVVDGAPATLRARLAEQYAQSGQPGIAGFPTT SNMWIVGR 214
                        **** .:***** * .: * .: .:.. * : * *:*.* * :*****:***:

sp|ATCC11105|ecPA      SKAQDAKAIMVNGPQFGWYAPAYTYGIGLHGAGYDVTGNTPFAYPGLVFGHNGVISWGST 357
sp|AAP20806|axPA      DHAKDARSILLNGPQFGWVNPAYTYGIGLHGAGFDVVGNTPFAYPSILFGHNAHVAVGST 274
                        .:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

sp|ATCC11105|ecPA      AGFGDDVDIFAERLSAEKPGYYLHNGKWKVMSREETITVKNGQAEFTVWRTVHGNILQ 417
sp|AAP20806|axPA      AGFGDDVDIYA EKLPADRNRYPFHGQWKLEKRTDLILVKDAAPVTL DVYRSVHGLIVK 334
                        *****:*****:.. . *:*:* * .: * * *.. . * :***** **

sp|ATCC11105|ecPA      TDQTTQTAYAKSRAWDGKEVASLLAWTHQMKAKNWQEWTTQQAAKQALTINWYYADVNGNI 477
sp|AAP20806|axPA      FDDAQHVAYAKARAWEGFELQSLMAWTRKTSANWEQWKTQAA RHALTINWYYADDRGNI 394
                        *:: :.*****:*** * * : **:*:*: : : *:*:* . *****:***** **

sp|ATCC11105|ecPA      GYVHTGAYPDRQSGHDPRLPVPVGTGKWDWKGLLPFEMNPKVYNPQSGYIANWNNSPQKDY 537
sp|AAP20806|axPA      GYAHTGFYPRRRPGHDPRLPVPVGTGEMDWLGLLPFSTNPQVYNPQSGFIANWNNQPMRGY 454
                        **.* ** * :*****:*****: ** * **.. **.* **..* **..* :.*

sp|ATCC11105|ecPA      PASDLFAFLWGGADRVT EIDRLLEQKPR----LTADQAWDVIRQTSRQDLNRLFLPTLQ 593
sp|AAP20806|axPA      PSTDLFAIVWGQADRYAEIETRLKAMTANGGKVS PQQMWDLIRTTSYADVNRHFLPFLQ 514
                        *:*****:*** ** * : * : . :.: * *:* ** * * * * * * *

sp|ATCC11105|ecPA      AATSGLTQSDPRRQLVETLTRWDGINLLNDDGKTWQQPGSAILNVWLT SMLKRTVVAAPV 653
sp|AAP20806|axPA      RAVQGLPADDPRVRLVAGLGGWDMNTSERE PGYYDNAGPAVMDAWLRAMLKRTLADEMP 574
                        *..** . ** * * * * : : : .:..* :*****: *****: . **

sp|ATCC11105|ecPA      MPFDKWYSASGYETTQDGPTGSLNISVGAKILYEAVQGDKSPIPQAVDLFAGKPQQEVVL 713
sp|AAP20806|axPA      ADFFKWYSATGYPTPQAPATGSLNLTG VKVLFNALAGPAAGVPQRYDFNGARADDVIL 634
                        * *****:** * . * *****:..*:*:*: * : : ** * * * * :*:

sp|ATCC11105|ecPA      AALEDTWETLSKRYGNNVSNWKT PAMALTFRANFFGVPQAAAEETR HQAEYQNRGTEND 773
sp|AAP20806|axPA      AALDDALAALRQAYGKDPAAWKIPAPPMV FAPKNFLGVPQADAKAVLSYPATQNRGTENN 694
                        *****: : * : * : * : * * * .: * .:*****:***** * : . . *****:

sp|ATCC11105|ecPA      MIVFSPTSDRPVLAWDVVAPGQSGFIAPDGTVDKHYEDQLKMYENFRKSLWLTKQDVE 833
sp|AAP20806|axPA      MIVFD----GKSVRAVDVVAPGQSGFVAPDGT P SPHTRDQFDLYNSFGSKRVWFTADEVR 750
                        * ** . :.: * * *****:***** . * ..*:..:..* * : * * :*:

sp|ATCC11105|ecPA      AHKESQEVLVHQR 846
sp|AAP20806|axPA      RNATSEETLRYRR 763
                        : *:*.*: :*

```

1.4 Выравнивание последовательностей ecПА и bmПА (29%)

```

sp|ATCC11105|ecPA      MKNRNRMIIVNCVTASLAMYWSLPALAEQSSSEIKIVRDEYGMPHIYANDTWHLFYGYGYV 60
sp|Q60136|bmPA       -MKTKWLISVILLFVFIFFQNLVFDGEDKNEGKVVVDNDFGVPHLYAKNKKDLYEAYGYV 59
      : : :* : : : . * * . . . . : * : * * * : * : * * * : * : * * * : * : * * *
      : : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * *

sp|ATCC11105|ecPA      VAQDRLFQMEMARRSTQGTVAEVLGKDFVKFDKDIRRN-YWPDAIRAQIAALSPEDEMSIL 119
sp|Q60136|bmPA       MAKDRLFQLEMFRGRNEGTVSEIFGEDYLSKDEQSRDGYSNKEIKKMIDGLDRQPKELI 119
      : * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
      : * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

sp|ATCC11105|ecPA      QGYADGMNAWIDKVNINPETLLPKQFNTFGFTPKRWEFPFDVAMIFVGTMANRFSDESTSEI 179
sp|Q60136|bmPA       AKFAEGISRYVNEALKDPDDKLSKEFHEYQFLPQKWTSTDVVVVYVMVSMY-YFMDNHQEL 178
      : * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

sp|ATCC11105|ecPA      DNLALLTALKDKYGVSGMAVFNQLKWLNVNPSAPTTIAVQESNYPLKFNQNSQTAALLP 239
sp|Q60136|bmPA       KNAEILAKLEHEYGTEVSRKMFDDLVWKNPDSAPTSIVSEGG-----P 221
      . * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
      . * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

sp|ATCC11105|ecPA      RYDLPAPMLDRPAKGADGALLALTAGKNRETIAAQFAQGGANGLAGYPTTSMNVVIGKSK 299
sp|Q60136|bmPA       KRSSSQSLQILSS-----AVIKASEKVGKERENFVQTSEELGLPLKIGSNAAIVGSEK 275
      : * : * : * : : . . . . * : * : . . . . * : * : . . . . * : * : . . . . *
      : * : * : * : : . . . . * : * : . . . . * : * : . . . . * : * : . . . . *

sp|ATCC11105|ecPA      AQDAKAIMVNGPQFGWYAPAYTYGIGLHGAGYDVTGNTPFAYPGLVFGHNGVISWGSTAG 359
sp|Q60136|bmPA       SATGNALLFSGPQVGFVAPGFLYEVGLHAPGFDMEGSGFIGYPFIMFGANNHFALSATAG 335
      : . : * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
      : . : * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

sp|ATCC11105|ecPA      FGDDVDIFAERLSAEKPGYYLHNGKWKVMSREETITVKNGQAE-----FTVWRTVHGNI 415
sp|Q60136|bmPA       YGNVTDIFEEKLNKNSQYLYKGGKWRDMEKRKESFTVKGDNGEKKTVEKIYYRTVHGVP 395
      : * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
      : * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

sp|ATCC11105|ecPA      LQTDQTTQTAYAKSRAWGKEVASLLAWTHQMKAKNQEWTTQQAQKQALTNWYYADVNG 475
sp|Q60136|bmPA       ISRDETINKVAYSXKSWFRGTEAQSMSAYMKANWAKNLKEFENAAEYTMNLWYYADKKG 455
      : . * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
      : . * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

sp|ATCC11105|ecPA      NIGYVHTGAYPDRQSGHDPRLPVPPTGKWDWKGLLPFEMNPKVYNPQSGYIANWNNSPQK 535
sp|Q60136|bmPA       DIAYYHVGRYPVRNSKIDERIPTPGTEYEWKGFIPFKENPHVINPKNGYVVNNWNNKPSK 515
      : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
      : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

sp|ATCC11105|ecPA      DYPASDLFAFLWGGADRVTEDRLLQKPRLTADQAWDVIRQTSRQDLNLRFLPTLQAA 595
sp|Q60136|bmPA       EWVN-GEYSFYWGEDNRVQYINGMEARGKVTLEDINEINYTASFAQLRANLFLKQLLIDV 574
      : : . : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
      : : . : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

sp|ATCC11105|ecPA      TSGLTQSD-PRRQLVETLTRWDGINLLNDDGKTWQQPGSAILNVWLTSMLKRTVVAAVPM 654
sp|Q60136|bmPA       LDKNKSTNGNYIYLIEKLEEWNNLKEDENKDGYYDAGIAAFFDEWNNLHDKLFMDL-- 632
      . . : : : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
      . . : : : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

sp|ATCC11105|ecPA      PFDKWYSASGYETTQDGTGSLNISVGAKILYEAVQGDKSPIPQAVDLFAGKPPQEVVLA 714
sp|Q60136|bmPA       -----GDFYGITKEITDHRYGASLAYKILNKESTNYK-----WVNVDQEKIIME 676
      . . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
      . . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

sp|ATCC11105|ecPA      ALEDTWETLSKRYGNNVSNWKTAMALTRANNFFGVPAQAAAEETRHQAEYQNRGTENDM 774
sp|Q60136|bmPA       STNEVLAKLQSEKGLKAEKWRMPIKMTFGEKSLGIPHYGYSMT--PIIEMNRGSENHY 734
      : : : . * . . . * . . . . * . . . . * . . . . * . . . . * . . . . * . . . .
      : : : . * . . . * . . . . * . . . . * . . . . * . . . . * . . . . * . . . .

sp|ATCC11105|ecPA      IVFSPTTSDRPVLAWDVVAPGQSGFIAPDGTVDKHYEDQLKMYENFGRKSLWLTQDVEA 834
sp|Q60136|bmPA       IEMTPTGPS----GFNITPPGQIGFVKKDGITISDHYDQLVMAEAWKFKPYLNFNKDINK 790
      * : * * * * . . . . . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
      * : * * * * . . . . . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

sp|ATCC11105|ecPA      HKESQEVLVHQR 846
sp|Q60136|bmPA       AAKNVSALNMSK 802
      : . . . * : : :
  
```


1.5 Выравнивание последовательностей ecПА и sПА (12%)

```

sp|ATCC11105|ecPA      MKNRRNRMIIVNCVTASLMYYWSLPALAEQSSSEIKIVRDEYGMPHIYANDTWHLFYGYGYV 60
tr|Q539C0|s1PA        MTFRNRLRLFAVSGLALEFVSASLPPAAASGAPEARHPSGGG---LSATVRYTEYGIPHI 57
      * . ***: : .*: : : * . . :*. : : . * : : : ** : :

sp|ATCC11105|ecPA      VAQDRLFQMEMARRSTQGTVAEVLGKDFVKFDKDIRRNYWPDAIRAQIAALS PEDMSILQ 120
tr|Q539C0|s1PA        VAKDYANLGFGTGWAQAADQVCTLADGFVTVRGERSKFFGPDAAPDFSLSSAAKNLSSDL 117
      ***: * : : . . *...***: : : : *** : : : : **

sp|ATCC11105|ecPA      GYADGMNAWIDKVNINPETLLPKQFNTFGFTPKRWEFPFDVAMIFVGTMANRFS DSTSEID 180
tr|Q539C0|s1PA        YFRG-----VRDSGTVEKLLKVPAPAGPSRDAKESMRGFAAGYNAWLRQNRDRIT 167
      : . : : : * : : : : : : * . : : . . *

sp|ATCC11105|ecPA      NLALLTALKDKYGVSQGMAVFNQLKWLNVNPSAPTTIAVQESNYPLKFNQONSQTAALLPR 240
tr|Q539C0|s1PA        DPACRGAS-----WVRPVTALDVAVRG----FALAVLGGQGRGIDGI 205
      : * * : : * . : : ***: : : : . * : :

sp|ATCC11105|ecPA      YDLPAPMLDRPAKGADGALLALTAGKNRETIAAQFAQGGANGLAGYPTTSNMVWIGSKSA 300
tr|Q539C0|s1PA        TAAQPPTAAPPAAGVTPKEAAAAAQR---LLSTQNADMGSNAVA-----FRGSTT 252
      . * ** * . * : * : : : ** * : * : . * : : * : :

sp|ATCC11105|ecPA      QDAKAIMVNGPQFGWYAPAYTYG-IGLHGAGYDVTGNTPFAYPGLVFGHNGVISWGSTAG 359
tr|Q539C0|s1PA        ANGRGLLLGNPHYPWDGRRFWQSQTIPGELNVAGGSLGSTTVSIGHNADVAWSHTVA 312
      : : : : : * : : : : : : * : : : : : : : : : * : :

sp|ATCC11105|ecPA      FGDDVDIFAERLSAEKPGYYLHNGKWKVMLSREETITVKNGQAEFTVWRTVHGNILQTD 419
tr|Q539C0|s1PA        TGVTLNLHQLTLDPADPTVYLVLDGKPKQRMTRIVAVPVKGAAPVTRTRQWVTRYGPVVTSL 372
      * : : : . * . . * ** : ** : * . * : : * . . . * * * * * * : : :

sp|ATCC11105|ecPA      -QITQTAYAKSRAWDGKEVASLLAWTHQMKAKNWQEWIQQAAKQALT-----INWYYA 471
tr|Q539C0|s1PA        GAALPLPWTASTAYALNDPNAVNLRSADTSLGFASKARSTAGIERALHRSQGLPWVNTIAA 432
      : : : * * : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : * *

sp|ATCC11105|ecPA      DVNGNIGYVHTGAYPDRQSGHDPRLPVP-GTGKWDWKGLLPFEMNPKVYNPQSGYIANWN 530
tr|Q539C0|s1PA        DRSGNSFFSQSVLPRITDELAARCS TPLGQATYPSAGLAVLDGSTSACALGS----DRD 488
      * . ** : : : . * . . * . . * . . . ** : : : . . . * : : :

sp|ATCC11105|ecPA      NSPQKDYPASDLFAFLWGGADRVT EIDRLLEQKPRLTADQAWDVIRQTSRQDLNLRFLP 590
tr|Q539C0|s1PA        AVQPGFIFGPGRMPTLKNAPYVENSND SAWLTNADRPLTGYERVFGTTATQRSIRTRGAI 548
      : . . : : : . . : : . * : * : . . : : : : : * :

sp|ATCC11105|ecPA      TLQAATSGLTQSDPRRQLVETLTRWDGINLLNDGKTWQQPGSAILNVWLT-SMLKRTVV 649
tr|Q539C0|s1PA        DVAAMAERGRLRVTDLERQQLANRAP TGDVLAADVAKWCAALPGGTAVGSSGTPVDVSA 608
      : * : . : : : : * : * : * * . . . * : : : : . . .

sp|ATCC11105|ecPA      AAVPMFPDKWYSASGYETTQDGP TGSNLISVGAKILYEAVQGDKSPIQAVDLFAGKPKQ 709
tr|Q539C0|s1PA        CPVLRWRDRSVDSDSRGALLFDRFWRKAAAVPAELWKVPFDAADPVRTPRGLNTAAPG- 667
      . . * : * : : : : : : : : * * * : : . * : . . * . . *

sp|ATCC11105|ecPA      EVVLAAL EDTWETLSKRYGNVSNWKT PAMALTFRANNFFGVPQAAA EETR---HQAEYQ 766
tr|Q539C0|s1PA        --VGKALADTVTELKAAG----IALNAPLGEHQFVVRNGKRIPVGGGTESLGIWNKIEPV 721
      * ** * * * . : : * * . . * : * . . . * : : *

sp|ATCC11105|ecPA      NRG TENDMIVFSPTTSDRPVLAWD----VVAPGQSGFIAPDGTVDKHYEDQLKMYENFGR 822
tr|Q539C0|s1PA        WNPAAGGYTEVSAGSSYIQAVGW DNSRCPVARTLLTYSQSSNPNSPHYSDQTRLFSGERW 781
      . : . . . * . : * . . . ** ** : : . . . . * . . . .

sp|ATCC11105|ecPA      KSLWLTKQDVEAHKESQEVLVH VQR- 846
tr|Q539C0|s1PA        VTSRFCEKDIARSPQLKVVVRVHERR 806
      : : : * : : : * : *

```

1.6 Выравнивание последовательностей ecPA и ttPA (21%)

```

sp|ATCC11105|ecPA      -----MEKRNRMIVNC-----VTASLM-YY---WSLP-----ALAEQSSSEIKIVRD
tr|Q72G76|ttPA      MLFPTMKRFLRGLVWLLGLFLFLALLLGFSGYLYLRASLPQEGEGRIALEGLSAPVEVVRD
          ** . * : *          : . : *      ***      * * : : : **

sp|ATCC11105|ecPA      EYGMFHIYANDTWHLFYGYGYVVAQDRLEQMEMARRSTQGTVAEVLGKDFVKFDKDIRRN
tr|Q72G76|ttPA      GKGVVIRIRAATLKDLFFAQGFVHAQERLWQMEFQRRVVGQRLSEILGEATLPQDRFLRTW
          * : * *      . : : . * * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

sp|ATCC11105|ecPA      YWPDAIRAQIAALSPEDMSILQGYADGMNAWIDKVNINPETLLPKQFNTFGFTPKRWEFF
tr|Q72G76|ttPA      GFYRAARAAYGKLYPEEKAVDAYAAGVNAFLASG-----APLPPEFRLLGFRPEPWTGP
          : * ** . * * : : . : : * * * : : . : : : * * : * . : * * * : *

sp|ATCC11105|ecPA      DVAMIFVGTMANRFS DST-SEIDNLALLTALKDKYGVSQGMVFN--QLKWLNVNPSAFTT
tr|Q72G76|ttPA      DVLVW-ARMMSYDLSGNWEEELKRHLL-----ARGVSPKRLELKPYPEDAPTIV
          ** : . * : * : . * : . * *          : : : : . : * *      . : * * .

sp|ATCC11105|ecPA      IAVQESNYPLKFNQQNSQTAALLPRYDLPAPMLDRPAKGADGALLALTAGKNRETIAAQF
tr|Q72G76|ttPA      LRAEDLKLFLKREE-----AFSALLR-----
          : : : : * * * : :          * . * * *

sp|ATCC11105|ecPA      AQQGANGLAGYPTTSMNWVIGKSKAQDAKAIMVNGPQFGWYAPAYTYGIGLHGAGYDVTG
tr|Q72G76|ttPA      -----MAPPRFMEASNWVAVGSRITETGKPFLLANDPHLAIQAPSLWFLMALEAPGLRAIG
          . : : : * * * * . * : : : . * : : * * : : . * * : : : . * . * . *

sp|ATCC11105|ecPA      NTFPAYPGLVFGHNGVISWGSTAGFGDDVDIFAERLSAEKPGYYLHNGKWKVMSREETI
tr|Q72G76|ttPA      ATLPGLPGVVIGRNERIAWGVTVNGADVEDLYLL--EVEVGRG-YR.VKGRVVVPGVREEVI
          * . * * : * : * * * : * * * . * * * : : . * * * * : : * * * * . *

sp|ATCC11105|ecPA      TVKNGQAETFTVWRTVHGNILQTDQTTQTAYAKSRAWDG--KEVASLLAWTHQMKAKNWQ
tr|Q72G76|ttPA      RVKGGREEVLKVRETIVYGPVITDALEDPPKTFMALRWVSLDEEDHILMAFLGVNRAGNWE
          * * * : * : * * . * * * : :          : * . : * * * : : * * * :

sp|ATCC11105|ecPA      EWTQQAA-KQALTIWYADVNGNIGYVHTGAYPDRQSGHDPRLPVPGTGKNDWKGLLPF
tr|Q72G76|ttPA      EFKKALLPYSAPSQNFFVYADVEGNIGYIAPGKFPVRKEGHTGMVFPVNGEWDWLGYYRRP
          * : : . * * : * : * : * * * : * * * : * * * * : * * * * : * * * *

sp|ATCC11105|ecPA      EMNPKVYNPQSGYIANWNNSPQ-KDYFASDLFAFLWGGADRVTEIDRLLQKPRLTADQA
tr|Q72G76|ttPA      EEWFQAFNPARGYLVTANHKVTPRGFFPY--ALTYDWAEPYRAERIEELLAKEKLSLEDM
          * * : : * * * * : * : . * . * * * : : * . * . * : * * * * * : * * : :

sp|ATCC11105|ecPA      WDVIRQTSRQDLNLRFLPTLQAATSGLIQSDPRRQLVETLTRWDGINLLNDDGKTWQQP
tr|Q72G76|ttPA      KAI-QQ-DQKSLLYRDFRPVLELLTP---LSEGARAWDRLLAWDGTMAPGS-----E
          : * * : : . * * * * : * * * : * * : * * * * .

sp|ATCC11105|ecPA      GSAILNVWLTSMKRTVVAAVPMFPFDKWYSASGYETTQDGPTGSLNISVGAKILYEAVQG
tr|Q72G76|ttPA      EALVFALWYTELTRLPQREV---GEAYW-DEPRYL-----LKALKEG
          : : : * * : : . * . *          : : : * * * * : *

sp|ATCC11105|ecPA      DKSPFQAVDLFAGKFPQ--QEVVLA-----ALEDTWETLSK-RYGNVNSNWKTPAMA
tr|Q72G76|ttPA      DENCD-QPETEYRESCLDYAALALERALDRKEALGARAWGEVHRARFPHAV-LHTPLKR
          * * . * * : . : : . *          : * : : * : . * * : * *

sp|ATCC11105|ecPA      LIFRANFFGVFQAAAEETRHQAEYQNRGTENDMIVFSPTT-----SDRFVLAWDVVA
tr|Q72G76|ttPA      LSDREVAFGG-DR-----Y-----TVNVGPFDPETLAMGHGFSYRQIV--DLSD
          * : * * * : . * * *          : : * * * * * * * : : * :

sp|ATCC11105|ecPA      PQQSGFIAPDG----TVDKHYEDQLKMYENFGRKSLWLTKQDVEAHKESQEVLVHVR---
tr|Q72G76|ttPA      MEGSLFVHEMGQSGHFLSRHYADLLPLWQRGDYLFMRFGA-----PLGRITLLEPLPS
          * * : * *      : : * * * * : : . : :          . * : :

sp|ATCC11105|ecPA      -
tr|Q72G76|ttPA      P

```

Приложение 2. «Праймеры».

3.1 Праймеры для секвенирования:

-100 for	CCC CTG TTG ACA ATT AAT CAT CGG
+400 for	CCA ATC CAG AGA CGC TCT TAC CAA AAC
+900 for	GCA ATC ATG GTA AAT GGT CCG CAG
+1400 for	CTA TGC TGA TGT AAA CGG CAA TAT TGG
+1900 for	GCC AGG CTC TGC CAT CCT GAA C

3.2 Праймеры для Quik Change ПЦР мутагенеза:

aR145G+bF256R _F	GCA CCA TGG CAA ACC TCT TCT CTG ATA GCA CTA GC
aR145G+bF256R _R	GCT AGT GCT ATC AGA GAA GAG GTT TGC CAT GGT GC
aR145G _F	GCA CCA TGG CAA ACG GCT TCT CTG ATA GCA CTA GC
aR145G _R	GCT AGT GCT ATC AGA GAA GCC GTT TGC CAT GGT GC
aA69F+bF71A _F	GGG ATC AAC GTT CGG TTT CGG CGA TGA TGT CG
aA69F+bF71A _R	CGA CAT CAT CGC CGA AAC CGA ACG TTG ATC CC
bD484H _F	CCG TGG AAC AGA AAA CCA TAT GAT TGT TTT CTC ACC
bD484H _R	GGT GAG AAA ACA ATC ATA TGG TTT TCT GTT CCA CGG
bS1C _F	GGG GTA TCC AAC GAC CTG CAA TAT GTG GGT GAT CG
bS1C _R	CGA TCA CCC ACA TAT TGC AGG TCG TTG GAT ACC CC
bF24A _F	GGT AAA TGG TCC GCA GGC TGG CTG GTA TGC
bF24A _R	GCA TAC CAG CCA GCC TGC GGA CCA TTT ACC
bF71A _F	CAA CGG CAG GTG CCG GCG ATG ATG TC

bF71A_R GAC ATC ATC GCC GGC ACC TGC CGT TG
bI177V_F CGA AAC AAG CAC TGA CCG TCA ACT GGT ACT ATG C
bI177V_R GCA TAG TAC CAG TTG ACG GTC AGT GCT TGT TTC G
bW154F_F GCG TCT TTG CTG GCC TTC ACT CAT CAG ATG AAG
bW154F_R CTT CAT CTG ATG AGT GAA GGC CAG CAA AGA CGC
bL220E_F GGG ACT GGA AAG GGG AAT TGC CTT TTG AAA TGA ACC
bL220E_R GGT TCA TTT CAA AAG GCA ATT CCC CTT TCC AGT CCC
aA186C+bS243C_F GCT GGT AAA CCC ATC ATG CCC AAC CAC TAT TGC
GCT AAC TGG AAC AAT TGT CCC CAA AAA GAT TAT CCC
GC
aA186C+bS243C_R GCA ATA GTG GTT GGG CAT GAT GGG TTT ACC AGC
GCG GGA TAA TCT TTT TGG GGA CAA TTG TTC CAG TTA
GC
aA173C+bA410C_F GGT GTA TCA CAA GGC ATG TGC GTA TTT AAT CAG TTG
CAA ATC ACC AAT CCC ACA GTG CGT TGA TCT GTT TGC
aA173C+bA410C_R CAA CTG ATT AAA TAC GCA CAT GCC TTG TGA TAC ACC
GCA AAC AGA TCA ACG CAC TGT GGG ATT GGT GAT TTG
bA306C+bV423C_F CTA CTC TGC AAG CAT GCA CAT CTG GTT TGA CAC AG
CAC AGC AGG AGG TTT GTT TGG CTG CGC TG
bA306C+bV423C_R CTG TGT CAA ACC AGA TGT GCA TGC TTG CAG AGT AG
CAG CGC AGC CAA ACA AAC CTC CTG CTG TG
bS1T+bT68S_F GGT ATC CAA CGA CCA CCA ATA TGT GGG TGA TCG

GTG ATT TCC TGG GGA TCA TCG GCA GGT TTC G

bS1T+bT68S_R CGA TCA CCC ACA TAT TGG TGG TCG TTG GAT ACC

CGA AAC CTG CCG ATG ATC CCC AGG AAA TCA C

bD484N_F CCG TGG AAC AGA AAA CAA TAT GAT TGT TTT CTC ACC

bD484N_R GGT GAG AAA ACA ATC ATA TTG TTT TCT GTT CCA CGG

bI329E_F CGT TGG GAT GGC GAG AAT TTG CTT AAT GAT GAT GG

bI329E_R CCA TCA TCA TTA AGC AAA TTC TCG CCA TCC CAA CG

bM485R_F GGA ACA GAA AAC GAT CGG ATT GTT TTC TCA CC

bM485R_R GGT GAG AAA ACA ATC CGA TCG TTT TCT GTT CC

bR297A_F CGT CAG GAT CTT AAC CTG GCG CTT TTT TTA CC

bR297A_R GGT AAA AAA AGC GCC AGG TTA AGA TCC TGA CG

bR533C_F CGA AAA TTT TGG CTG TAA GTC GCT CTG GTT AAC G

bR533C_R CGT TAA CCA GAG CGA CTT ACA GCC AAA ATT TTC G

bW500C_F CCT GTG CTT GCC TGT GAT GTG GTC G

bW500C_R CGA CCA CAT CAC AGG CAA GCA CAG G

bQ292R_F CCA GTC GTC GCG ATC TTA ACC TGA GGC

bQ292R_R GTT AAG ATC GCG ACG ACT GGT TTG GCG

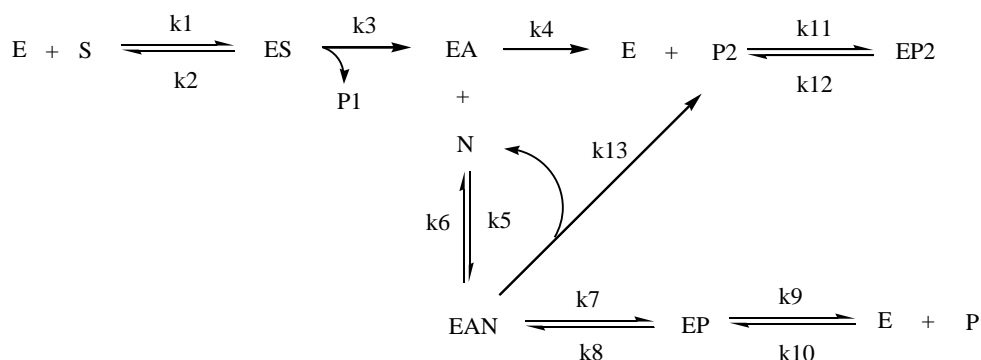
3.3. Фланкирующие праймеры по концам гена PAC:

Hind III rev CTC TAG AGC CAA GCT TCT GCA GGT CGA CC

NdeI for GCG CAA GGA AAA ACA TAT GAA AAA TAG AAA TCG

Синтез праймеров проводили в ЗАО «Евроген».

Приложение 3. «Программа»



Начальные условия и константы

```
> restart;
> with(linalg):
```

Warning, the protected names norm and trace have been redefined and unprotected

Начальные концентрации и элементарные константы

```
> E0:=3.6e-07:
  S0:=0.0105:
  N0:=0.0105:
  P0:=0:
  P20:=0:
```

```
S_get:=0:
N_get:=0:
P_get:=0:
P2_get:=0:
```

```
alfa:=30:
beta:=280:
gama:=0.06:
```

```
  Ks:=3.7e-3:
  Kp2:=4.2e-3:
  Kp:=7.9e-2:
  Kn:=1572500.*k3*60/(-4250000.*k3*60-4250000.*k4*60-
1572500.*k4*60*beta+999.*k3*60*60*k4*beta):
```

```
  k1:=1e8:
  k2:=k1*Ks:
  k3:=93:
  k4:=70:
  k5:=1e8:
  k6:=k5*Kn:
  k7:=beta*Kn*k4:
  k8:=alfa*Kp*k3/Ks:
```

```

k9:=k10*Kp:
k10:=1e8:
k11:=1e8:
k12:=k11*Kp2:
k13:=gama*k7:

```

Интервал времени и количество точек на графике

```

time_start:=0:
time_end:=5400:
n:=1000:

```

текст программы
Система дифф. уравнений

```

> t1:=time():
> dsys8:={
    diff(ES(t),t)=k1*(E0-EA(t)-EP(t)-ES(t)-EAN(t)-EP2(t))*S(t)-(k2+k3)*ES(t),
    diff(EA(t),t)=k3*ES(t)-(k4+k5*N(t))*EA(t)+k6*EAN(t),
    diff(EAN(t),t)=k5*EA(t)*N(t)+k8*EP(t)-EAN(t)*(k6+k7+k13),
    diff(EP(t),t)=k7*EAN(t)+k10*(E0-EA(t)-EP(t)-ES(t)-EAN(t)-EP2(t))*P(t)-
(k8+k9)*EP(t),
    diff(EP2(t),t)=k11*P2(t)*(E0-EA(t)-EP(t)-ES(t)-EAN(t)-EP2(t))-k12*EP2(t),
    diff(S(t),t)=-k1*(E0-EA(t)-EP(t)-ES(t)-EAN(t)-EP2(t))*S(t)+k2*ES(t),
    diff(P(t),t)=k9*EP(t)-k10*P(t)*(E0-EA(t)-EP(t)-ES(t)-EAN(t)-EP2(t)),
    diff(P2(t),t)=k4*EA(t)-k11*(E0-EA(t)-EP(t)-ES(t)-EAN(t)-
EP2(t))*P2(t)+k12*EP2(t)+k13*EAN(t),
    diff(N(t),t)=-k5*EA(t)*N(t)+(k6+k13)*EAN(t),
ES(0)=0,EA(0)=0,EAN(0)=0,EP(0)=0,EP2(0)=0,S(0)=S0,P(0)=P0,N(0)=N0,P2(0)=P20
}:

```

Численное решение системы дифф.уравнений (по умолчанию gear)

```

> dsol := dsolve(dsys8, numeric, stiff=true, output=listprocedure):

```

Вызов решения (по компонентам)

```

> fyEA:= eval(EA(t),dsol):
fyEAN:= eval(EAN(t),dsol):
fyES := eval(ES(t),dsol):
fyEP:=eval(EP(t),dsol):
fyEP2:= eval(EP2(t),dsol):
fyN:= eval(N(t),dsol):
fyP:= eval(P(t),dsol):
fyP2:=eval(P2(t),dsol):
fyS:=eval(S(t),dsol):

```

Формирование массива данных

```
> step:=(time_end-time_start)/n:
> time_:=array(0..n):
  E:=array(0..n):
  EA:=array(0..n):
  EAN:=array(0..n):
  EP:=array(0..n):
  EP2:=array(0..n):
  ES:=array(0..n):
  N:=array(0..n):
  P:=array(0..n):
  P2:=array(0..n):
  S:=array(0..n):
P_prev:=array(-1..n): P_prev[-1]:=0:

> for i from 0 to n do
                                t:=time_start+i*step:
                                time_[i]:=t:
                                E[i]:=E0-fyEA(t)-fyEP(t)-fyES(t)-fyEAN(t)-fyEP2(t):
                                EA[i]:=fyEA(t):
                                EAN[i]:=fyEAN(t):
                                EP[i]:=fyEP(t):
                                ES[i]:=fyES(t):
                                EP2[i]:=fyEP2(t):
                                N[i]:=fyN(t):
                                P[i]:=fyP(t):
                                P2[i]:=fyP2(t):
                                S[i]:=fyS(t):
                                P_prev[i]:=fyP(t):
                                if (P[i]>P_prev[i-1]) then pmax:=P[i]: nmax:=N[i]: smax:=S[i]: tm:=t: end if:
                                end do:
t2:=time():
                                Конверт
> dataX:=convert(time_,list):
  dataY1:=convert(E,list):
  dataY2:=convert(EA,list):
  dataY3:=convert(EAN,list):
  dataY4:=convert(EP,list):
  dataY5:=convert(ES,list):
  dataY6:=convert(N,list):
  dataY7:=convert(P,list):
  dataY8:=convert(P2,list):
  dataY9:=convert(S,list):
  dataY10:=convert(EP2,list):
```


Вывод

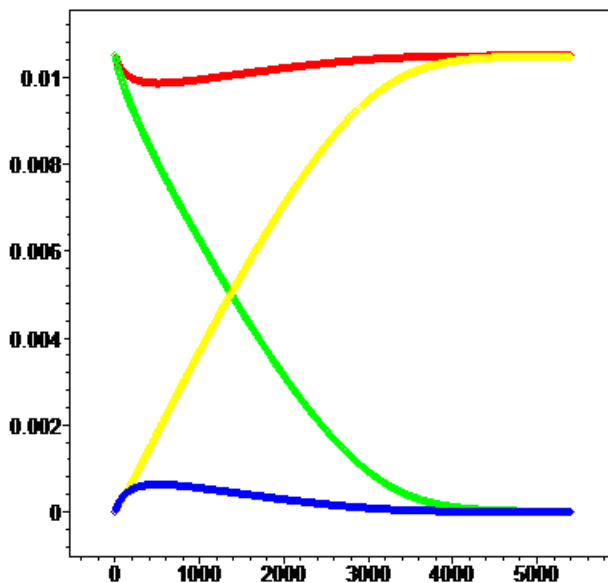
```
> with(stats):
```

```
plot_E:=statplots[scatterplot](dataX,dataY1,color=pink):  
plot_EA:= statplots[scatterplot](dataX,dataY2,color=brown):  
plot_EAN:= statplots[scatterplot](dataX,dataY3,color=orange):  
plot_EP:= statplots[scatterplot](dataX,dataY4,color=violet):  
plot_ES:= statplots[scatterplot](dataX,dataY5,color=magenta):  
plot_EP2:= statplots[scatterplot](dataX,dataY10,color=black):  
plot_Nucleofil:= statplots[scatterplot](dataX,dataY6,color=red):  
plot_Product:= statplots[scatterplot](dataX,dataY7,color=blue):  
plot_PG:= statplots[scatterplot](dataX,dataY8,color=yellow):  
plot_Substrate:= statplots[scatterplot](dataX,dataY9,color=green):
```

Графическое описание модели

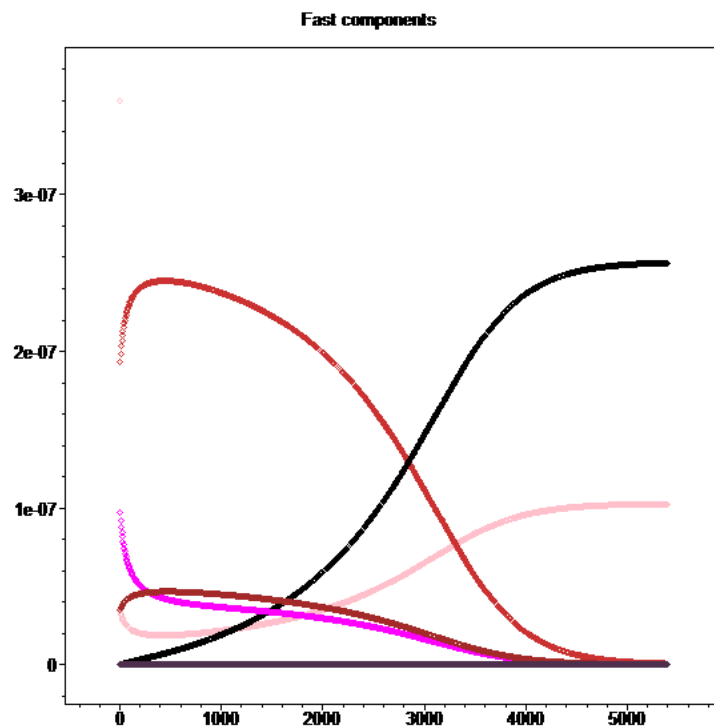
```
> plots[display]({
```

```
plot_Substrate,  
plot_Product,  
plot_Nucleofil,  
plot_PG  
},axes=boxed,title=`Slow components`);  
Slow components
```



```
> plots[display]({
```

```
plot_E,  
plot_ES,  
plot_EA,  
plot_EAN,  
plot_EP,  
plot_EP2  
},axes=boxed,title=`Fast components`);
```



Экспериментальные данные

	A	B	C	D	E
1	<i>time</i>	<i>Substrate</i>	<i>Nucleofill</i>	<i>Product</i>	<i>PG</i>
2	0.	0.0105	0.0114	0.	0.
3	60.	0.00966	0.0106	0.0000534	0.000532
4	120.	0.00879	0.0104	0.000215	0.00105
5	180.	0.00875	0.0115	0.000276	0.00163
6	240.	0.00755	0.0109	0.000288	0.00208
7	300.	0.00691	0.0105	0.000356	0.00249
8	360.	0.00643	0.01	0.000499	0.00325
9	420.	0.00593	0.00997	0.000577	0.00359
10	480.	0.00544	0.00977	0.000668	0.0041
11	540.	0.00501	0.00984	0.000617	0.00462
12	600.	0.00445	0.00978	0.000567	0.0055
13	720.	0.00362	0.00974	0.000703	0.0059
14	840.	0.0029	0.00970	0.000753	0.0068
15	960.	0.00223	0.00963	0.000833	0.0073
16	1080.	0.00174	0.00943	0.000739	0.0077
17	1200.	0.00123	0.00939	0.000801	0.008

18	1320.	0.000977	0.00949	0.000787	0.0086
19	1440.	0.000650	0.00940	0.000778	0.0088
20	1560.	0.000498	0.00926	0.000764	0.0091
21	1680.	0.000375	0.00943	0.000708	0.0093
22	1800.	0.000220	0.00931	0.000611	0.0095
23	2010.	0.000189	0.00975	0.000575	0.0098
24	2160.	0.	0.00941	0.000565	0.0099
25	2340.	0.	0.00969	0.000440	0.0100
26	2520.	0.	0.00963	0.000435	0.0101
27	2760.	0.	0.00948	0.000326	0.0101
28	2880.	0.	0.00964	0.000378	0.0102
29	3120.	0.	0.00960	0.000231	0.0102
30	3300.	0.	0.00960	0.000245	0.0102
31	3420.	0.	0.00960	0.000203	0.0102
32	3600.	0.	0.00960	0.000158	0.0102
33	3900.	0.	0.00960	0.000163	0.0102
34	4200.	0.	0.00960	0.000164	0.0102
35	4800.	0.	0.00960	0.0000694	0.0103
36	5400.	0.	0.00960	0.0000949	0.0103
37					
38					

текст программы

```
> with( Spread ):
> for j from 2 to infinity do
  if type(GetCellValue(ssid1, j, 1),float)
  then nspread:=j;
  else break
  end if
end do;
```

```
> nspread;
```

36

```
> time_exp:=array(1..nspread-1):
  substrate_exp:=array(1..nspread-1):
  product_exp:=array(1..nspread-1):
  nucleofil_exp:=array(1..nspread-1):
  PG_exp:=array(1..nspread-1):
```

```

> for i from 2 to nspread do
  time_exp[i-1]:=GetCellValue(ssid1, i, 1):
  substrate_exp[i-1]:=GetCellValue(ssid1, i, 2):
  nucleofil_exp[i-1]:=GetCellValue(ssid1, i, 3):
  product_exp[i-1]:=GetCellValue(ssid1, i, 4):
  PG_exp[i-1]:= GetCellValue(ssid1, i, 5):
end do:

```

Конверт

```

> dataX_exp:=convert(time_exp,list):
  dataY1_exp:=convert(substrate_exp,list):
  dataY2_exp:=convert(nucleofil_exp,list):
  dataY3_exp:=convert(product_exp,list):
  dataY4_exp:=convert(PG_exp,list):

```

Вывод

```

> with(stats):
  plot_substrate_exp:=
statplots[scatterplot](dataX_exp,dataY1_exp,color=green,thickness=15):
  plot_nucleofil_exp:=
statplots[scatterplot](dataX_exp,dataY2_exp,color=red,thickness=15):
  plot_product_exp:=
statplots[scatterplot](dataX_exp,dataY3_exp,color=blue,thickness=15):
  plot_PG_exp:=
statplots[scatterplot](dataX_exp,dataY4_exp,color=yellow,thickness=15):
Warning, these names have been redefined: anova, describe, fit, importdata, random, statevalf, statplots, transform

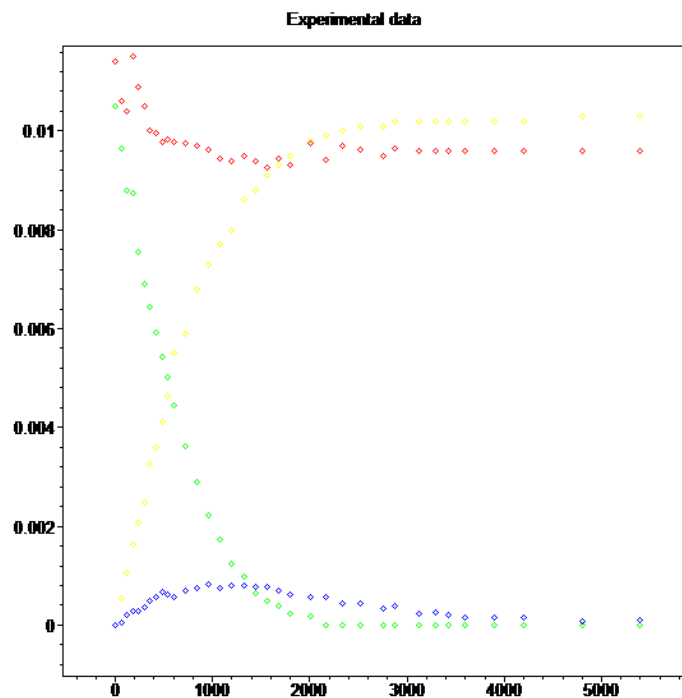
```

Сопоставление экспериментальных данных с моделью

```

> plots[display]({
  plot_substrate_exp,
  plot_product_exp,
  plot_nucleofil_exp,
  plot_PG_exp
},axes=boxed,title=`Experimental data`);

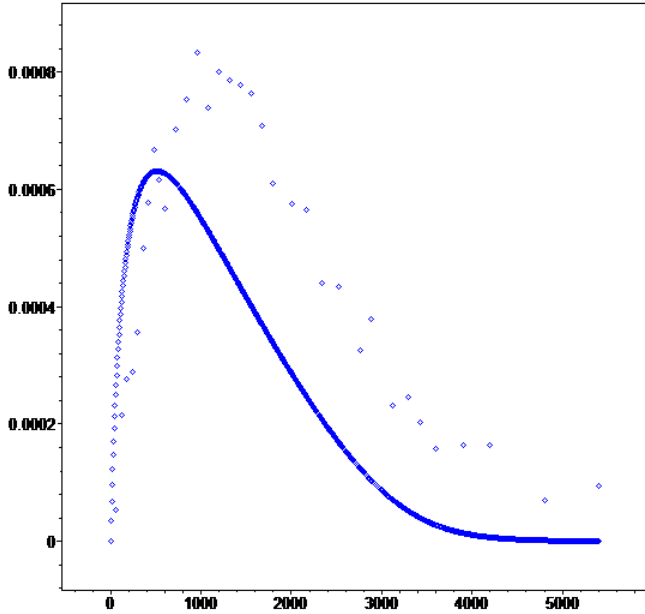
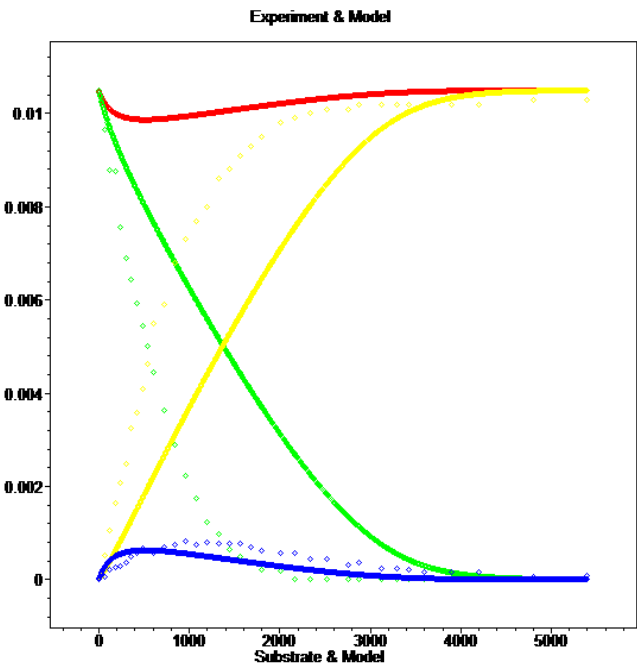
```



```
> plots[display]({plot_Substrate,
  plot_Product,
  plot_Nucleofil,
  plot_PG,
  plot_product_exp,

  plot_PG_exp,
  plot_substrate_exp
},axes=boxed,title=`Experiment & Model`);
```

```
plots[display]({plot_Product,
  plot_product_exp
},axes=boxed,title=`Substrate & Model`);
```



Ошибка эксперимента

Приложение 4. «Биоинформатический анализ семейства ПА»

С целью установления наиболее различающихся остатков внутри семейства ПА и установления их аминокислотного распределения был проведен биоинформатический анализ в программе Zebra [139]. На основании анализа множественного выравнивания были получены различные разбиения на подгруппы (п/гр), одно из них представлено в таблице БА1 (приведены только позиции, рассматриваемые в данной работе). Позиции отсортированы по уменьшению специфичности. Специфичной позицией называется позиция, характеризующаяся идентичным аминокислотным составом внутри подгруппы, но различным внутри группы.

Таблица БА1. Биоинформатический анализ семейства ПА (с добавлением ГА и АГЛА). Нумерация соответствует есПА.

позиция	ранк	Z	P	п/гр 1 (есПА)	п/гр 2 (afПА)	п/гр 3 (abПА)	п/гр 4 (bmПА)	п/гр 5* (ГА)	п/гр 6* (АГЛА)
bF24	1	2,1	1,0	F(100%)	F(90%) M(10%)	Q(100%)	V(100%)	L(100%)	F(76%) Y(18%)
bF71	8	1,8	$9,9 \cdot 10^{-1}$	F(80%) A(20%)	P(90%) M(10%)	S(100%)	Y(100%)	T(56%) G(18%)	T(76%) S(21%)
bW154	18	1,6	$8,8 \cdot 10^{-1}$	W(100%)	W(100%)	W(100%)	Y(100%)	W(38%) Y(34%)	W(77%) S(7%)
bN388	25	1,6	$5,6 \cdot 10^{-1}$	N(100%)	N(60%) R(30%)	Q(100%)	D(100%)	н.д.	н.д.
bI177	26	1,6	$5,2 \cdot 10^{-1}$	I(85%) V(15%)	I(100%)	I(100%)	L(100%)	F(90%) Y(4%)	V(93%) F(4%)
bD484	48	1,5	$5,8 \cdot 10^{-3}$	D(50%) N(50%)	N(80%) D(20%)	F(90%) Y(10%)	H(100%)	A(76%) S(8%)	Q(93%) M(5%)
bW500	50	1,4	$7,0 \cdot 10^{-3}$	W(50%) V(40%)	C(100%)	C(100%)	F(100%)	M(26%) Y(20%)	Q(31%) R(25%)
bM485	56	1,4	$1,6 \cdot 10^{-3}$	M(65%) L(35%)	R(90%) K(10%)	R(80%) Q(20%)	Y(100%)	A(56%) M(20%)	V(40%) A(20%)
bR533	62	1,3	$1,1 \cdot 10^{-3}$	R(25%) K(30%)	C(100%)	C(100%)	F(100%)	L(46%) F(24%)	W(67%) L(22%)
aS149*	68	0,4	$5,8 \cdot 10^{-7}$	S(16%) A(32%)	T(75%) Y(25%)	A(80%) S(8%)	N(75%) I(25%)	S(39%) N(37%)	G(100%)
bE266	116	1,0	$3,8 \cdot 10^{-7}$	E(80%) V(10%)	E(100%)	E(90%) A(10%)	Q(100%)	R(65%) Q(19%)	F(51%) G(14%)
bI329	150	0,8	$5,4 \cdot 10^{-8}$	I(35%) M(40%)	M(50%) Q(20%)	K(90%) R(10%)	L(100%)	Q(36%) E(18%)	R(41%) T(21%)
bR297	154	0,8	$1,5 \cdot 10^{-8}$	R(90%) G(10%)	R(90%) D(10%)	R(100%)	N(75%) H(25%)	D(88%) E(8%)	D(22%) E(18%)
bL220	196	0,5	$3,1 \cdot 10^{-8}$	L(20%) M(35%)	I(80%) V(10%)	F(90%) L(10%)	F(100%)	Y(24%) T(20%)	I(68%) L(14%)
bE482	276	-0,2	$7,3 \cdot 10^{-2}$	E(100%)	E(80%) Q(20%)	A(90%) L(10%)	E(100%)	Y(38%) W(33%)	Y(86%) F(9%)
bF256	324	-0,6	$9,3 \cdot 10^{-1}$	F(45%) I(35%)	Y(70%) M(10%)	S(90%) A(10%)	Y(50%) F(25%)	P(90%) L(4%)	Q(43%) R(18%)
bQ292	352	-0,9	1,0	Q(10%) A(40%)	S(60%) A(20%)	S(90%) A(10%)	A(100%)	R(72%) Q(8%)	R(33%) E(25%)

* - приведены данные из различных разбиений. Z - очки за специфичность, в соответствии с нормальным распределением. P - статистическая значимость результата.