

УДК 577.15.1

КАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И СТАБИЛЬНОСТЬ РЕКОМБИНАНТНОЙ ПЕРОКСИДАЗЫ ТАБАКА С ЗАМЕНОЙ PE37MET

А.А. Полозников², Г.С. Захарова^{2,3}, Т.А. Чубарь^{1,2,3}, Д.М. Хушпульян^{1,2}, И.Г. Газарян¹, В.И. Тишков^{1,2,3*}

(¹кафедра химической энзимологии химического факультета, МГУ, ²ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», ³Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва, Россия; e-mail: vitishkov@gmail.com)

Методом направленного мутагенеза получена мутантная пероксидаза табака (ТОР) с заменой Pe37Met. Данная мутация имитирует пероксидазу сои, в которой остаток Met37 отвечает за повышенную стабильность. Мутантная ТОР Pe37Met экспрессировалась в клетках *E. coli* BL21(DE3) CodonPlus в виде нерастворимых телец включения. Уровень экспрессии составил более 40% от общего белка клетки. Активный фермент получали с помощью рефолдинга по методике, разработанной для рекомбинантной пероксидазы табака дикого типа. Были исследованы субстратная специфичность, каталитическая активность и термостабильность мутантной ТОР Pe37Met. Показано, что введение данной мутации приводит не к увеличению стабильности фермента, а к снижению его каталитических свойств.

Ключевые слова: пероксидаза табака, мутагенез, рефолдинг, термостабильность.

Список использованных в статье сокращений: ТОР – табачная пероксидаза; SBP – пероксидаза сои; ИПТГ – изопропилтиогаалактозид; ДТГ – дитиотреитол; АБТС – 2,2'-азино-бис-[3-этилбензтиазолин-6-сульфонат].

Пероксидазы (КФ 1.11.1.X) относятся к ферментам класса оксидоредуктаз. Они катализируют окисление широкого спектра субстратов под действием пероксида водорода. Исследование выделенной в нашей лаборатории пероксидазы табака (ТОР) позволило выявить ряд необычных свойств этого фермента. Наиболее существенное отличие от ранее изученных пероксидаз состояло в значительно большей каталитической активности по отношению к люминолу. Немаловажно, что высокий уровень сигнала достигался без добавления соединений-усилителей хемилюминесценции [1]. Фермент продемонстрировал также большую устойчивость к инактивации пероксидом водорода по сравнению с широко используемой на практике пероксидазой хрена [2]. Эти отличительные свойства пероксидазы табака могут послужить основой при создании биосенсоров для определения концентрации пероксида водорода, являющегося продуктом большого числа биохимических реакций, и для использования данного фермента в качестве метки. В нашей лаборатории было проведено изучение взаимосвязи между структурой и функциями пероксидазы табака.

В ходе исследования ТОР продемонстрировала большую операционную стабильность, а также стабильность при хранении в растворе. Кроме того, ТОР проявила стабильность в широком диапазоне pH (например, ТОР способна катализировать реакцию окисления вератрового спирта при значениях pH < 2) [3].

Как известно, пероксидаза сои (SBP) также обладает повышенной стабильностью [4] и высокой активностью при низких значениях pH [5]. Как правило, потеря активности пероксидазами в процессе термоинактивации связана с диссоциацией гема и полипептидной цепи. Но в случае SBP была обнаружена повышенная аффинность к гему. Эксперименты по изучению структуры SBP показали (рис. 1) наличие в активном центре фермента трех остатков метионина – Met37, Met279 и Met282 [6]. Остаток Met37 расположен на удалении 3,9 Å от C8-винильной группы гема, поэтому между ними возможно возникновение Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий [7]. При этом у других растительных пероксидаз в положении 37 обычно располагаются аминокислотные остатки Leu и Val. Было выдвинуто предположение, что остатки Met37, Met279 и Met282 образуют кластер вокруг

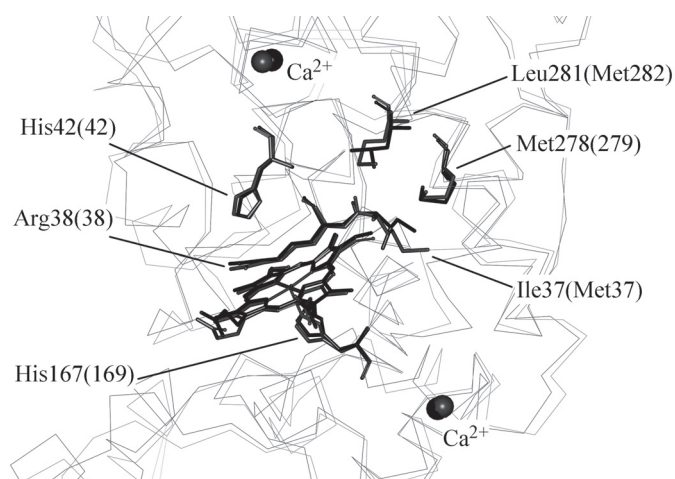


Рис. 1. Сравнение трехмерных структур пероксидазы сои (PDB 1FHF; показана серым цветом) и пероксидазы табака (показана черным цветом). В скобках указаны положения аминокислотных остатков для пероксидазы сои

С8-винильной группы гема. *p*-Орбитали атомов серы находятся в состоянии, допускающем перенос электрона между остатком Met37 и π -катион-радикалом гема в Соединении I. Этим может объясняться высокая устойчивость SBP к потере гема, а следовательно, и большая термостабильность. Еще одним возможным объяснением высокой стабильности SBP является предположение, что окисление Met37 может предохранять каталитически важные остатки активного центра от окисления [6].

У TOP в положении 37 вместо метионина находится остаток изолейцина. Мы решили провести направленный мутагенез TOP и изучить, как повлияет замена Ile37Met на стабильность и активность пероксидазы табака. Полученная мутантная форма TOP Ile37Met была экспрессирована в клетках *E. coli*, выделена и охарактеризована.

Методы исследования

Мутагенез

Направленный мутагенез осуществляли с помощью набора «Quik-Change» фирмы «Stratagene» (США). В качестве основы использовали плазмиду рTOP2, полученную клонированием кДНК TOP в плазмиду рЕТ40b [8]. После проведения реакции мутагенеза реакционная смесь была использована для трансформации клеток *E. coli* TG1. Трансформированные клетки высевали на чашки Петри с агаризованной средой 2 YТ (16 г/л бактотриптона, 10 г/л дрожжевого экстракта и 5 г/л хлорида натрия, pH 7,0), содержащую канамицин в концентрации 40 мкг/мл, а затем чашки инкубировали в течение ночи при 37°C.

На следующий день с чашки брали 4 колонии, ресуспендировали каждую в 4 мл среды 2YT с канамицином (40 мкг/мл) и культивировали в течение ночи при 30°C. Полученную биомассу клеток использовали для выделения плазмид. Выделение плазмид проводили с использованием набора для выделения плазмид «Nucleospin Plasmid» фирмы «Machery-Nagel» (Германия). Секвенирование полученных плазмид проводили на автоматическом секвенаторе ДНК «ABI PRISM 3100-Avant». Для экспрессии мутантной TOP и фермента дикого типа проводили соответствующими плазмидами трансформацию клеток *E. coli* BL21(DE3)Codon Plus.

Экспрессия

Единичную колонию трансформированных клеток *E. coli* BL21(DE3) Codon Plus культивировали в 3 мл среды 2YT в присутствии 40 мкг/мл канамицина и 25 мкг/мл хлорамфеникола в течение ночи при 31°C и 180 об/мин. Затем из этой пробирки отбирали 1 мл культуральной жидкости и помещали в 200 мл той же среды, находящейся в качалочной колбе объемом 1 л. Культивирование проводили при 31°C и 100 об/мин. В начале логарифмической фазы роста клеток проводили индукцию экспрессии добавлением в среду ИПТГ до конечной концентрации 0,2 мМ. Далее температуру снижали до 27°C и культивировали клетки в течение 6 ч (до концентрации клеток 5–7 г/л). Биомассу собирали центрифугированием при 5000 g.

Выделение пероксидазы табака

Осадок клеток ресуспендировали в 2 М растворе NaCl, содержащем 10 мМ ДТТ, и разрушали ультразвуком в течение 3 мин при 22 кГц с последующим 7-минутным охлаждением на льду (процедуру повторяли трое-кратно). Затем полученный раствор инкубировали в течение 1,5 ч при комнатной температуре при постоянном перемешивании на магнитной мешалке. Далее проводили центрифугирование (13500 g, 20 мин). Супернатант удаляли, а осадок дважды промывали 50 мМ Трис-HCl (pH 8,5) и солибилизировали в 6 М растворе мочевины, содержащей 1 мМ ДТТ.

Рефолдинг

Солюбилизированный апобелок (95% чистоты) приливали по каплям к среде для рефолдинга и инкубировали при 4°C. Состав среды для рефолдинга был оптимизирован нами ранее для TOP дикого типа и включал мочевины (1,8 М), окисленный глутатион (0,5 мМ), ДТТ (0,1 мМ), CaCl₂ (1 мМ), гемин (5 мкМ),

глицерин (5%) в 50 мМ буфере Трис-НСI (рН 9,5). Во время инкубации измеряли каталитическую активность по АБТС. После прекращения роста активности раствор фермента концентрировали на ячейке Amicon через мембрану YM-10.

Очистка ренатурированного фермента

Препарат фермента после концентрирования наносили порциями по 3 мл на колонку (2,6×90 см) с Sephacryl S200, уравновешенным 50 мМ буфером Трис-НСI (рН 8,5). Фракции, содержащие активный фермент, объединяли и концентрировали. Вторичную очистку проводили на колонке (2,6×60 см) с Toyopearl HW-55, уравновешенным тем же буфером. Фракции, содержащие активный фермент, объединяли и концентрировали. Содержание белка определяли по эмпирической формуле

$$C \text{ (мкг/мл)} = 183 \cdot A_{230} - 75,8 \cdot A_{260},$$

где A_{230} и A_{260} – поглощение при 230 и 260 нм соответственно [9]. Предварительно было подтверждено, что результаты определения концентрации белка по этой методике хорошо коррелируют с результатами определения по методу Лоури и др. [10]. Чистоту полученных препаратов контролировали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях по методу Laemmli [11].

Определение значения RZ

Значение RZ (Reinheitszahl) определяли как отношение поглощения при 403 нм к поглощению при 275 нм.

Измерение каталитической активности

Каталитическую активность определяли на основании фотометрической детекции образования окрашенных продуктов реакции. Скорость реакции окисления донорных субстратов при их насыщающей концентрации измеряли при 25°C в приведенных ниже условиях.

АБТС – реакционная смесь содержала 0,36 мМ АБТС и 5 мМ H_2O_2 в 0,1 М Na-ацетатном (рН 4,5 или 5,0); коэффициент экстинкции продукта окисления АБТС на 405 нм был принят равным $36\,800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [12].

Гваякол – реакционная смесь содержала 2,25 мМ гваякола и 5 мМ H_2O_2 в 0,1 М К-фосфатном буфере (рН 7,0), содержащем 0,05% CaCl_2 ; коэффициент экстинкции продукта окисления на 470 нм был принят равным $5\,570 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [13].

Фенол/4-аминоантипирин – реакционная смесь содержала 10 мМ фенола, 0,1 мМ 4-аминоантипирина

и 5 мМ H_2O_2 в 0,1 М К-фосфатном буфере (рН 7,0); коэффициент экстинкции продукта окисления на 510 нм был принят равным $6\,580 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [14].

Ферроцианид – реакционная смесь содержала 0,6 мМ ферроцианида калия и 5 мМ H_2O_2 в 0,1 М К-фосфатном буфере (рН 7,0); коэффициент экстинкции продукта окисления на 420 нм принят равным $1040 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [15].

o-Дианизидин – реакционная смесь содержала 0,15 мМ o-дианизидина и 5 мМ H_2O_2 в 0,1 М калий-фосфатном буфере (рН 7,0); коэффициент экстинкции продукта окисления на 460 нм был принят равным $30000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [16].

o-Фенилендиамин – реакционная смесь содержала 1 мМ субстрата и 1 мМ H_2O_2 в 0,1 М Na-ацетатном буфере (рН 5,0); коэффициент экстинкции продукта окисления на 445 нм был принят равным $11000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [17].

Суммарную и удельную активность выражали в E и $E/\text{мг}$ (мкмоль окисленного в 1 мин субстрата на 1 мг белка).

Расчет каталитических констант

Константы скорости в реакции окисления АБТС, катализируемой TOP, определяли на основании данных стационарной кинетики. Для этого варьировали концентрации обоих субстратов: в диапазоне 0,015–0,15 мМ для АБТС и 0,010–0,5 мМ для H_2O_2 . Определение точной концентрации пероксида водорода осуществляли методом спектрофотометрии, используя при этом значение коэффициента экстинкции $\epsilon_{240} = 43,6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [18].

Термоинактивация

Изучение термостабильности ферментов проводили при 56°. Микропробирки объемом 0,5 мл с аликватами фермента (3,3 мкМ) объемом 30 мкл в 50 мМ Tris-НСI, буфере (рН 8,0) инкубировали в термостате (точность термостатирования $\pm 0,1^\circ\text{C}$) и через определенные интервалы времени отбирали по одной пробирке. Для охлаждения отобранные пробирки помещали в холодную воду (4°C) и затем центрифугировали для удаления возможного осадка. Далее измеряли величину остаточной активности фермента по АБТС.

Результаты и их обсуждение

Культивирование и экспрессия

Результаты секвенирования показали, что все выделенные после проведения реакции мутагенеза плазмиды содержали только требуемую мутацию, обеспечивающую замену Ile37Met, а другие нуклеотидные

замены отсутствовали. Для экспрессии мутантной TOP Pe37Met были использованы те же условия, что и для TOP дикого типа (см. Методы исследования), за исключением температуры культивирования (температура была понижена с 37 до 31°C до индукции ИПТГ и с 35 до 27°C после индукции ИПТГ). Фермент экспрессировался в виде нерастворимых телец включения. Уровень экспрессии составлял около 40% общего белка (50–60 мг на 1 л культуральной среды) (рис. 2). После разрушения клеток и промывки полученного осадка от растворимых белков были получены нерастворимые осадки целевых рекомбинантных пероксидаз (около 95% чистоты). Для получения активных форм ферментов была проведена процедура рефолдинга.

Рефолдинг

На рис. 3 приведен график зависимости каталитической активности в рефолдинг-среде для TOP дикого типа и для мутанта Pe37Met от времени инкубации с момента добавления солилизированного апо-фермента в среду для рефолдинга (здесь и далее активность TOP измерялась по отношению к АБТС).

Максимального значения активность в рефолдинг-среде достигала на четвертые сутки. После этого проводили концентрирование фермента для последующей хроматографической очистки.

Очистка ренатурированного фермента

Очистку ренатурированного фермента проводили путем гель-фильтрации (см. Методы исследования).

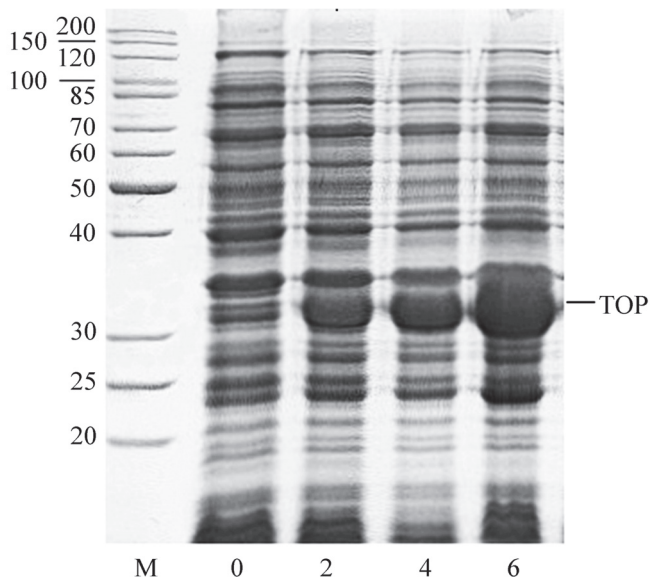


Рис. 2. Экспрессия TOP Pe37Met в штамме *E. coli* BL21(DE3) CdPlus через 0, 2, 4 и 6 ч после индукции ИПТГ

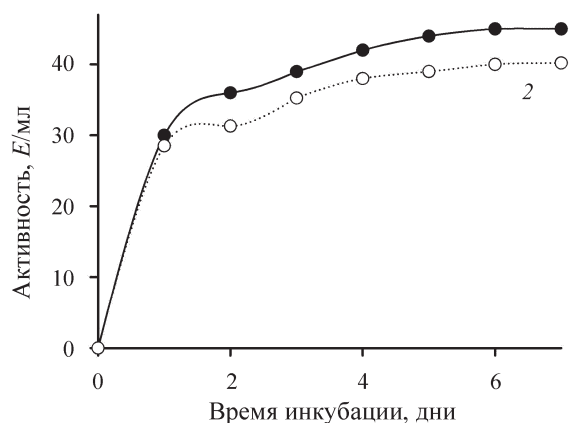


Рис. 3. Рост активности в процессе рефолдинга: 1 – TOP дикого типа (TOP WT), 2 – мутанта (TOP Pe37Met)

В табл. 1 представлены данные по очистке TOP дикого типа и мутантного фермента с заменой Pe37Met. Значение RZ очищенного фермента в обоих случаях равнялось 3, что считается признаком высокоочищенного фермента для классических пероксидаз. Чистота полученных ферментных препаратов подтверждена с помощью электрофореза (данные не приведены). Как видно из табл. 1, в случае мутантной TOP Pe37Met удалось достичь большей степени очистки, однако удельная активность фермента была в 5,3 раза ниже по сравнению с ферментом дикого типа.

Каталитическая активность

Результаты определения удельной активности мутантной TOP Pe37Met приведены в табл. 2, откуда видно, что активность по отношению к объемным ароматическим субстратам существенно снизилась, тогда как активность по отношению к субстратам меньшего размера сохранилась на уровне фермента дикого типа. По-видимому, это связано с тем, что введение мутации приводит к изменению конформации центра связывания субстратов.

Таблица 1

Результаты очистки мутантной пероксидазы табака TOP Pe37Met и фермента дикого типа (из 0,5 л культуральной среды)

Показатель	Пероксидаза	
	TOP Pe37Met	wt-TOP
Общий белок, мг	1,50	0,75
Общая активность, E	1125	3005
Удельная активность, E/мг	750	4005
Степень очистки, разы	6,25	3,9
RZ	3,0	3,0

Т а б л и ц а 2

Субстратная специфичность рекомбинатных пероксидазы табака дикого типа (wt-TOP), мутантной TOP Пе37Met и пероксидаза из корней хрена дикого типа (wt-HRP)

Субстрат	Удельная активность, Е/мг		
	wt-TOP	TOP Пе37Met	wt-HRP
АБТС (рН 4,5)	4000	780	2000
АБТС (рН 5,0)	1200	230	2000
Ферроцианид	210	70	9
Иодид	0,5	0,5	110
Гваякол	1550	55	1750
Фенол	26	30	7,5
<i>o</i> -Фенилендиамин	1300	545	460
<i>o</i> -Дианизидин	550	50	520

Кинетические параметры реакции окисления АБТС

Реакция окисления АБТС под действием пероксида водорода, катализируемая гем-содержащими пероксидазами, протекает по механизму типа «пинг-понг»:



где АН₂ – электрон-донорный субстрат, АН[•] – радикальный продукт реакции.

При этом зависимость скорости реакции от концентрации субстратов выражается следующим уравнением:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{[E]_0} \left(\frac{1}{k_U} + \frac{1}{k_{\text{H}_2\text{O}_2} \cdot [\text{H}_2\text{O}_2]} + \frac{1}{k_S \cdot [S]} \right),$$

где $[E]_0$ – начальная концентрация фермента; k_U соответствует мономолекулярной скорости-лимитирующей стадии; $k_{\text{H}_2\text{O}_2}$ – константа скорости второго порядка по пероксиду водорода; k_S – константа скорости второго порядка по субстрату-донору, в данном случае АБТС. На основании полученных экспериментальных данных были рассчитаны кинетические параметры окисления АБТС. Как видно из приведенных на рис. 4 графиков, характер протекания реакции окисления АБТС под действием TOP Пе3Met соответствует механизму «пинг-понг», как и для TOP дикого типа.

Для определения кинетических констант вначале были построены графики зависимости скорости реакции от концентрации АБТС в двойных обратных координатах (координаты Лайнуивера–Берка) для разных фиксированных концентраций пероксида водорода (рис. 4, а). В данных координатах зависимость носит линейный характер, при этом прямые, полученные для разных концентраций H₂O₂, параллельны. Из их тангенса угла наклона была определена константа скорости второго порядка по АБТС. После этого был построен вторичный график зависимости величины отсекаемого на оси ординат отрезка

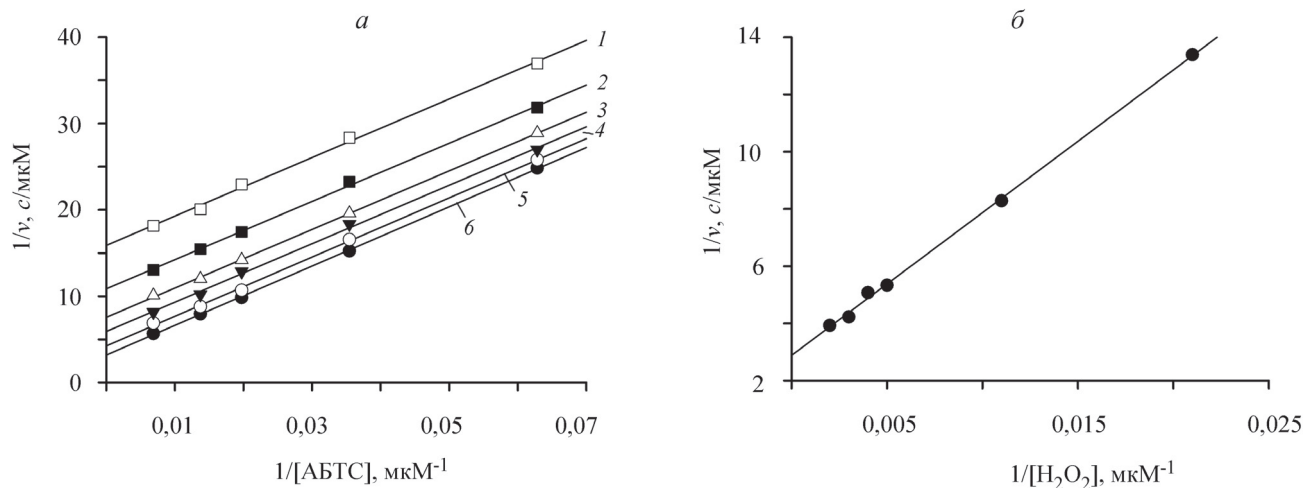


Рис. 4. Зависимость в двойных обратных координатах начальной скорости реакции окисления АБТС пероксидом водорода под действием мутантной формы пероксидазы табака Пе37Met от: а – концентрации АБТС при различных фиксированных концентрациях H₂O₂ (1–6 – концентрации АБТС 45, 90, 200, 250, 300 и 500 мкМ соответственно) и б – от концентрации H₂O₂ при насыщающей концентрации АБТС

от обратной концентрации пероксида водорода (рис. 4, б). Из тангенса угла наклона вторичного графика была определена константа скорости второго порядка по пероксиду водорода.

Полученные значения констант приведены в табл. 3, откуда видно, что в случае мутантной TOP Pe37Met константа скорости реакции взаимодействия с пероксидом водорода практически не изменилась, однако наблюдается сильное падение константы взаимодействия с АБТС. Возможным объяснением может служить предположение, что в процессе катализа происходит окисление введенного остатка метионина, что в свою очередь приводит к конформационным изменениям в области активного центра, которые препятствуют корректному взаимодействию Соединения I пероксидазы табака с АБТС.

Термостабильность

Термостабильность TOP дикого типа и ее мутанта с заменой Pe37Met была изучена при 56°C. Оказалось, что зависимости остаточной активности от времени для обоих ферментов описываются кинетикой реакции первого порядка. Значения констант скорости термоинактивации первого порядка для TOP дикого типа и ее мутанта с заменой Pe37Met составили $(7,3 \pm 0,4) \times 10^{-2}$ и $(7,7 \pm 0,3) \times 10^{-2} \text{ мин}^{-1}$ соответственно, т.е. скорость термоинактивации TOP Pe37Met осталась приблизительно

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 13-04-02013-а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Gazarian I.G., Lagrimini L.M., George S.J., Thorneley R.N.F. // J. Biochem. 1996. **320**. P. 369.
- Gazaryan I.G., Rubtsova M.Yu., Kapeliuch Yu.L., Rodriguez-Lopez J.N., Lagrimini L.M., Thorneley R.N.F. // Photochem. Photobiol. 1998. **67**. P. 106.
- Gazaryan I.G., and Lagrimini L.M. // Phytochemistry. 1996. **41**. P. 1029.
- McEldoon J.P., and Dordick J.S. // Biotechnol. Prog. 1996. **12**. P. 555
- McEldoon J. P., Pokora A. R., Dordick J. S. // Enzyme Microb. Technol. 1995. **17**. P. 359.
- Henriksen A., Mirza O., Indiani C., Teilum K., Smulevich G., Welinder K.G., Gajhede M. // Protein Sci. 2001. **10**. P. 108.
- Amisha Kamal J.K., Digambar V. Behere // Biochem. Engineer. J. 2008. **38**. P. 110
- Хушпулян Д.М., Савицкий П.А., Рожкова А.М., Чубарь Т.А., Фечина В.А., Сахаров И.Ю., Лагримини Л.М., Тишков В.И., Газарян И.Г. // Биохимия. 2003. **68**. С. 1480.
- Patterson W.R., Poulos T.L. // Biochemistry. 1995. **34**. P. 4331.
- Piontek K., Glumoff T., Winterhalter K. // FEBS Lett. 1993. **315**. P. 119.
- Laemmli U.K. // Nature. 1970. **227** (5259). P. 680.
- Childs R.E., Bardsley W.G. // Biochem. J. 1975. **145**. P. 93.
- Hosoya T. // J. Biochem. 1960. **47**. P. 794.
- Gallati H. // J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 1997. **15**. P. 699.
- Hasinoff F., Dunford H.B. // Biochemistry. 1970. **9**. P. 4930.
- Лебедева О.В., Угарова Н.Н., Березин И.В. // Биохимия. 1977. **42**. С. 1372.
- Gallati H. and Brodbeck H. // J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 1982. **20**. P. 221.
- Paler-Martinez A., Panus P.C., Chumley P.H., Ryan U., Hardy M.M., Freeman B.A. // Arch. Biochem. Biophys. 1994. **311**. P. 79.

Поступила в редакцию 11.11.13

Т а б л и ц а 3

Кинетические параметры рекомбинантных пероксидаз табака в реакции окисления АБТС

Фермент	Константа скорости	
	$k_{\text{H}_2\text{O}_2} \times 10^6, \text{M}^{-1}\text{c}^{-1}$	$k_{\text{АБТС}} \times 10^6, \text{M}^{-1}\text{c}^{-1}$
wt-TOP	3,6±0,4	8,2±0,9
Pe37Met	3,1±0,3	0,55±0,06

но на уровне пероксидазы табака дикого типа. Следовательно, введение замены Pe37Met не приводит к росту стабильности фермента.

Таким образом, в данной работе была получена мутантная пероксидаза табака с заменой Pe37Met. Изучение ее свойств показало, что введение такой замены приводит к сильному падению каталитической активности по сравнению с ферментом дикого типа. Термостабильность TOP Pe37Met по сравнению с исходным ферментом практически не изменилась. Очевидно, предположение о том, что остаток метионина в положении 37 может стабилизировать Соединение I, является неверным. Возможно, в процессе катализа происходит окисление введенного остатка метионина, что приводит к конформационным изменениям в активном центре фермента и падению активности по отношению к ароматическими субстратами.

CATALYTIC PROPERTIES AND STABILITY OF RECOMBINANT TOBACCO PEROXIDASE WITH AMINO ACID CHANGE ILE37MET

A.A. Poloznikov, G.S. Zakharova, T.A. Chubar, D.M. Hushpulian, I.G. Gazaryan, V.I. Tishkov

(Department of Chemical Enzymology, Faculty of Chemistry, Moscow State University, Moscow, Russia, Innovations and High Technologies MSU Ltd., Moscow, Russia, Bakh Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia)

The Ile37Met substitution was generated in tobacco anionic peroxidase (TOP) by site-directed mutagenesis to mimic the soybean peroxidase (SBP), in which Met37 is responsible for the increased thermal stability. TOP Ile37Met has been expressed in *E. coli* BL21(DE3) CodonPlus and accumulated in inclusion bodies. The expression level of the constructed enzyme was approximately 40% of the total *E. coli* protein. The enzyme was reactivated into an active and soluble form via a refolding procedure that was optimized based on the earlier developed protocol for wild-type TOP. The substrate specificity, catalytic activity and thermostability of TOP Ile37Met were investigated. It was shown that the introduction of Ile37Met mutation does not increase the stability of the enzyme and on the contrary, leads to a reduction of the catalytic properties of the enzyme.

Key words: tobacco peroxidase, mutagenesis, refolding, thermostability.

Сведения об авторах: *Полозников Андрей Александрович* – соотр. ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», канд. хим. наук; *Захарова Галина Сергеевна* – мл. науч. сотр. лаборатории молекулярной инженерии Института биохимии им. А.Н. Баха РАН; мл. науч. сотр. ООО «Инновации и высокие технологии МГУ»; *Чубарь Татьяна Анатольевна* – ассистент кафедры химической энзимологии МГУ, науч. сотр. лаборатории молекулярной инженерии Института биохимии им. А.Н. Баха РАН, сотр. ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», канд. хим. наук; *Хушпульян Дмитрий Михайлович* – мл. науч. сотр. кафедры радиационной химии МГУ, сотр. ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», канд. хим. наук; *Газарян Ирина Георгиевна* – вед. науч. сотр. кафедры химической энзимологии МГУ, докт. хим. наук, профессор; *Тишков Владимир Иванович* – профессор химического факультета МГУ, зав. лабораторией молекулярной инженерии Института биохимии им. А.Н. Баха РАН; сотр. ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», докт. хим. наук, профессор.