

Министерство образования и науки Российской Федерации

УДК
ГРНТИ
Инв. №

УТВЕРЖДЕНО:
Исполнитель: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра Российской академии наук
От имени Руководителя организации _____/Гречкин А.Н./ М.П.

НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКИЙ ОТЧЕТ

о выполнении Государственного контракта
№ 16.740.11.0197 от 24 сентября 2010 г. и Дополнения от 22 марта 2012 г. № 1

Исполнитель: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра Российской академии наук
Программа (мероприятие): Федеральная целевая программа «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 гг., в рамках реализации мероприятия № 1.3.1 Проведение научных исследований молодыми учеными - кандидатами наук.
Проект: Мини-ферменты липоксигеназного каскада растений
Руководитель проекта: Топоркова Яна Юрьевна

Казань
2012 г.

СОДЕРЖАНИЕ

1. ВВЕДЕНИЕ	4
2. ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ. Обобщение результатов по биоинженерии молекул модельных форм ферментов липоксигеназного каскада.	8
2.1. Обобщение результатов структурных и функциональных исследований модельных форм ферментов липоксигеназного каскада.	8
2.2. Подготовка предложений по биоинженерии мини-ферментов.	42
3. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	44
4. СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ	45

ВВЕДЕНИЕ

Липоксигеназный сигнальный каскад – источник сигнальных оксипинов, играющих важную роль в жизнедеятельности растений [1]. Оксипины ответственны за регуляцию роста, дифференциации, морфогенеза, а также участвуют в индукции органогенеза и формировании системной устойчивости растений к различным экстремальным факторам и патогенам [2;3]. Ключевыми ферментами липоксигеназного каскада, обеспечивающими разнообразие продуктов, являются липоксигеназы и ферменты уникального семейства CYP74 суперсемейства P450. Липоксигеназа (ЛОГ) катализирует диоксигенирование ненасыщенных жирных кислот, имеющих (1,4-*цис,цис*)-пентадиеновое основание [4]. Продукты липоксигеназной реакции – гидроперекиси жирных кислот – преобразуются ферментами CYP74: алленоксидсинтазами (АОС), гидропероксидлиазами (ГПЛ), дивинилэфирсинтазами (ДЭС). Исследования последних лет, в том числе руководителя Проекта, показали, что большинство ферментов CYP74 являются дегидразами (алленоксидсинтаза и дивинилэфирсинтаза) и изомеразы (гидропероксидлиаза). В то же время, большое разнообразие неохарактеризованных генов CYP74 в геномах различных растений свидетельствует о вероятности существования других типов катализа.

Было проведено множество работ, в том числе исполнителями Проекта, направленных на изучение особенностей механизмов реакций, катализируемых данными ферментами, исследование вторичных и третичных структур, а также определение значения отдельных структурных компонентов (доменов) и отдельных аминокислотных остатков в формировании определенного типа катализа. Кроме того, много внимания было уделено исследованию значения продуктов реакций липоксигеназной системы для растений. Все полученные и систематизированные данные позволили провести классификацию ферментов в зависимости от типа каталитического действия и субстратной специфичности и поставить перед

исследователями новую цель – создание мини-ферментов с заданными каталитическими свойствами. Получение мини-ферментов, выполняющих каталитические функции липоксигеназ и ферментов CYP74, позволит использовать их для создания генетически модифицированных растений, удовлетворяющих требованиям современного сельскохозяйственного производства, и разработки инновационных технологий переработки сырья с использованием биокатализаторов, в том числе иммобилизованных ферментов.

При использовании в качестве сырья экстрактов растений возникает опасность получения набора различных изоформ фермента, обладающих сходными физико-химическими свойствами, но различающихся по ферментативной активности. Использование разработанной в последнее время технологии рекомбинантных ДНК и различных систем экспрессии открывает возможность получения рекомбинантных белков, в том числе и инженерных форм мини-ферментов, для последующего использования в промышленности. Данная технология также облегчает проведение направленных модификаций первичной структуры изучаемых белков, позволяет внести дополнительные последовательности, облегчающие дальнейшую работу с препаратами рекомбинантных ферментов. Кроме того, получение мини-ферментов возможно исключительно на основе рекомбинантных генов ферментов растений.

Относительно механизмов катализа, определяющих специфичность действия ферментов липоксигеназного каскада, единого мнения у исследователей не существует. Например, предложенные модели взаимодействия активного центра липоксигеназ с арахидоновой и линолевой кислотами достаточно хорошо описывают каталитические свойства (n+2)-специфичных липоксигеназ, однако не согласуются с экспериментальными данными, полученными при изучении (n-2)-специфичных липоксигеназ [5-7]. В литературе отсутствуют структурные данные о фермент-субстратных комплексах для липоксигеназ и ферментов семейства CYP74, хотя имеются

данные о структуре отдельных ферментов [5,8,9] или комплексов с ингибиторами [10].

Отсутствие данных о фермент-субстратном комплексе для липоксигеназ и недостаточное исследование фермент-субстратных комплексов для ферментов СУР74 не позволяют проводить высокоточное моделирование взаимодействия субстрата и активного центра, а также проводить поиск ингибиторов липоксигеназного каскада. Однако такие данные являются крайне необходимыми для поиска лекарственных средств-ингибиторов ферментов липоксигеназного каскада млекопитающих, участвующих в процессах воспаления и развития опухолей. Получение рентгеноструктурных моделей данных ферментов крайне затруднено, в том числе и в связи со значимыми размерами.

Решением этой проблемы явился рациональный дизайн моделей ферментов, обладающих заранее определенными каталитическими свойствами и структурой. Сконструированные модели мини-ферментов отличаются от своих природных аналогов отсутствием отрицательных свойств, что облегчает их использование в качестве модельных объектов для исследований и промышленного использования. Аминокислотная последовательность мини-фермента соответствует активному центру нативного фермента. Исходя из результатов анализа структуры инженерных форм мини-ферментов и их комплексов с субстратами с помощью ЯМР высокого разрешения, будут получены дополнительные данные по механизмам каталитических реакций.

Современная ЯМР спектроскопия широко используется для решения широкого круга задач как в органической химии по идентификации структуры относительно небольших органических молекул, так и в молекулярной биологии при расшифровке пространственной структуры биополимеров – белки, пептиды, фрагменты ДНК и РНК. На сегодняшний день накоплен большой инструментарий различных импульсных последовательностей для решения подобных структурных задач. И

становится возможным выбирать необходимые экспериментальные методы индивидуально под исследуемое соединение или класс соединений, которые можно объединить друг с другом по какому-либо признаку.

В настоящее время методы компьютерного моделирования все чаще применяются для решения различных биофизических и биохимических задач. Выбор конкретного метода исследования (квантовая химия, молекулярная динамика, докинг) определяется, прежде всего, поставленной задачей. Для предсказания структуры и энергии взаимодействия белков с лигандами чаще всего используют метод докинга. Молекулярный докинг – это метод молекулярного моделирования, который позволяет предсказать наиболее энергетически выгодную для образования устойчивого комплекса ориентацию и положение одной молекулы по отношению к другой при достаточно небольших затратах компьютерного времени.

Целью Проекта являлась биоинженерия мини-ферментов на основе аминокислотных последовательностей каталитических доменов исходных ферментов липоксигеназного каскада растений. Кроме того, целью Проекта было также содействие развитию научно-образовательной и приборной базы для подготовки студентов, аспирантов и молодых ученых в области биоинженерии, физико-химической, молекулярной и клеточной биологии, и повышению квалификации специалистов биохимического и молекулярно-биологического профиля. Для реализации цели данного Проекта в результате выполнения всех промежуточных этапов исследований необходимо выполнить последний этап – обобщение результатов по биоинженерии молекул модельных форм ферментов липоксигеназного каскада.

В рамках данного этапа решались следующие задачи:

1. Обобщение результатов структурных и функциональных исследований модельных форм ферментов липоксигеназного каскада.
2. Подготовка предложений по биоинженерии мини-ферментов.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

1. Обобщение результатов структурных и функциональных исследований модельных форм ферментов липоксигеназного каскада.

Для реализации Проекта были выбраны природные варианты рекомбинантных белков: алленоксидсинтазы LeAOS3 томата и липоксигеназы ZmLOX3 кукурузы.

Ранее в литературе было предложено несколько моделей взаимодействия активного центра липоксигеназ с арахидоновой и линолевой кислотами. Эти модели достаточно хорошо описывают каталитические свойства (13*S*)-специфичных липоксигеназ, однако не согласуются с экспериментальными данными, полученными при изучении (9*S*)-специфичных липоксигеназ, которой является ZmLOX3.

Для конструирования мини-фермента, моделирующего LeAOS3 (цитохром P450 семейства CYP74) в структуре цитохромов P450 были выявлены консервативные области (Рис. 1).

К настоящему времени проведен ряд исследований трехмерной структуры цитохромов P450 [11-16], в том числе представителей семейства CYP74 [17, 18]. Все цитохромы P450 имеют несколько субстрат-распознающих сайтов (СРС).

Шесть предполагаемых субстрат-распознающих сайтов, определенных с помощью рентгеноструктурной кристаллографии цитохромов в комплексе с субстратом, рассеянно расположены по первичной структуре и составляют 16% всех остатков. Точечные мутации и химерные фрагменты, влияющие на субстратную специфичность цитохромов P450, находятся в участках СРС или перекрываются с ними (Рис. 2).

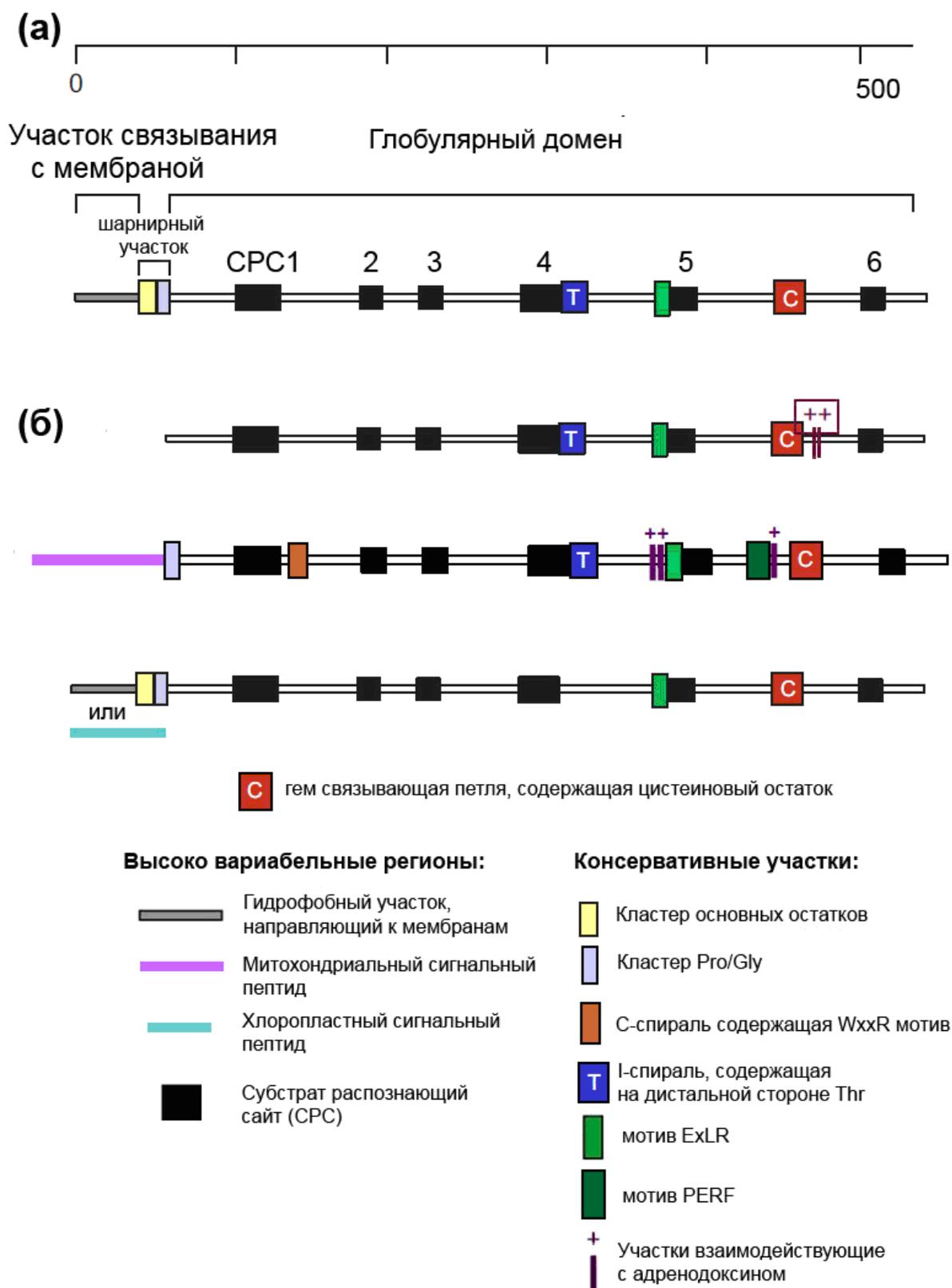


Рис. 1. Схема структуры цитохромов P450: (а) общая организация; (б) варианты структур (сверху вниз): бактериальные, митохондриальные, мембраносвязанные (или пластидные) цитохромы P450 [19, 20].

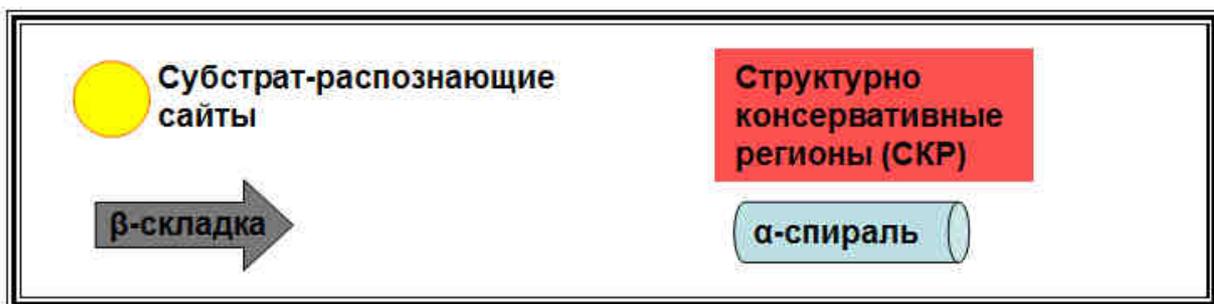
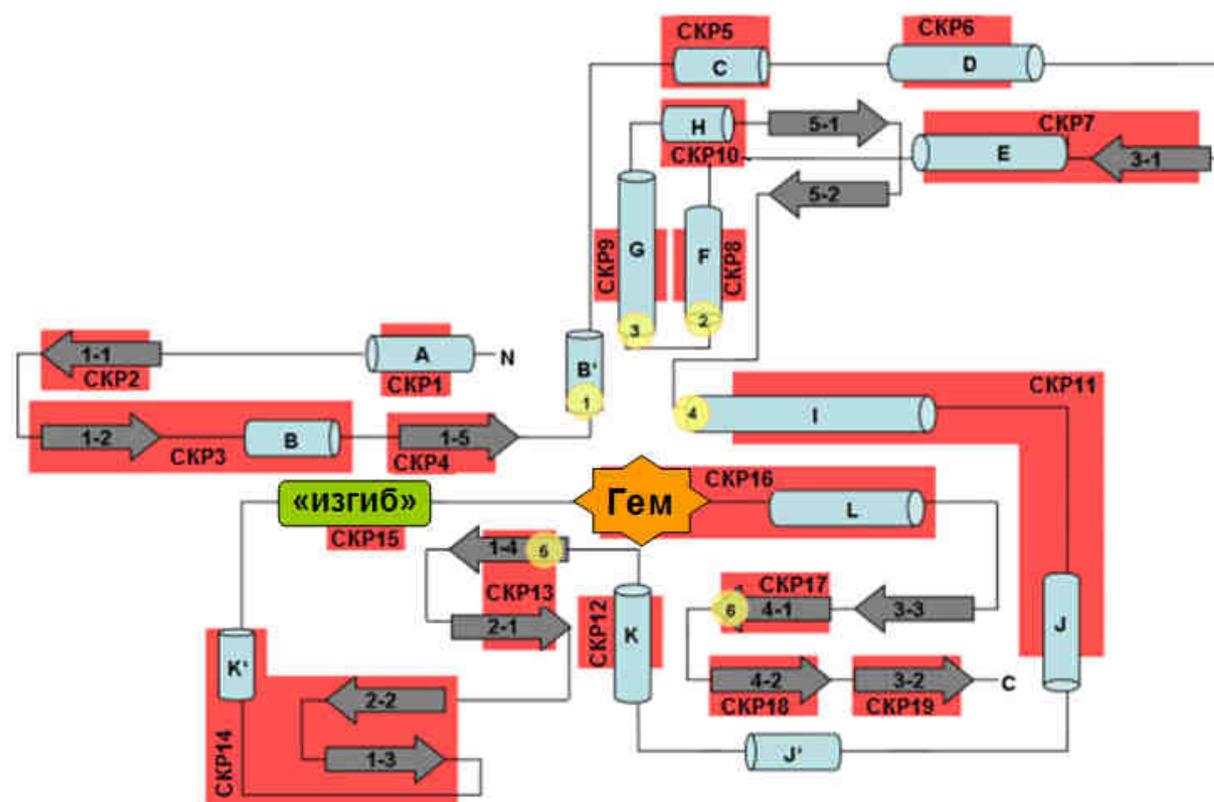


Рис. 2. Консервативные структуры белковой молекулы цитохрома Р450. Для более наглядного представления взаимного расположения консервативных структур и СРС относительно гема и друг друга молекула изображается в плоскости в развернутом виде [21].

Некоторые СРС образуют стенки полости цитохрома P450, например, I-спираль [19, 22, 23]. СРС-4 [24], входящий в ее состав, участвует в катализе монооксигеназной реакции. Центральная часть I-спирали монооксигеназы (имеющая консервативный мотив A/G-G-X-D/ET/S-T/S) называется «кислород-связывающим и активирующим доменом».

Сконструированная на основе гомологии трехмерная модель ZmLOX3 (ESyPred3D) обладает классической трехмерной структурой липоксигеназы растений (Рис. 3): фермент содержит N-концевой домен, для которого характерно большое количество наличие β -складчатых областей, и C-концевой домен, большую часть которого составляют α -спирали. Пространственное разделение двух доменов позволяет предположить, что они выполняют разные функции в составе липоксигеназы. Однозначно ответить на данный вопрос можно с помощью методики получения мини-ферментов, основанном на разделении этих доменов. N-домен размером 161 аминокислотных остатков с высокой достоверностью (E -value=9e-41) классифицируется как PLAT-домен (Полицистин-1, липоксигеназа), участвующий во взаимодействии с гидрофобными участками мембраны и свободными жирными кислотами [25].

Рентгеноструктурные данные о комплексе липоксигеназы и субстрата не получены до сих пор. Однако позиционирование субстрата в активном центре и участвующие в этом аминокислотные остатки вызывают особый интерес, так как открывают перспективы для создания мини-ферментов. На основе трехмерных структур можно построить модель взаимодействия субстрата и активного центра фермента. Так, моделирование взаимодействия субстрата и активного центра было проведено для ZmLOX3.

Для ZmLOX3 отмечен небольшой по объему субстрат-связывающий карман. Небольшой размер доступного для субстрата объема полости осуществляется за счет увеличения боковых групп аминокислотных остатков. Так, полость I ZmLOX3 ограничена аминокислотными остатками Leu269, Gly270, Tyr271, Ser272, Ile273, Ile556, Ile771, Leu772, Ile862.

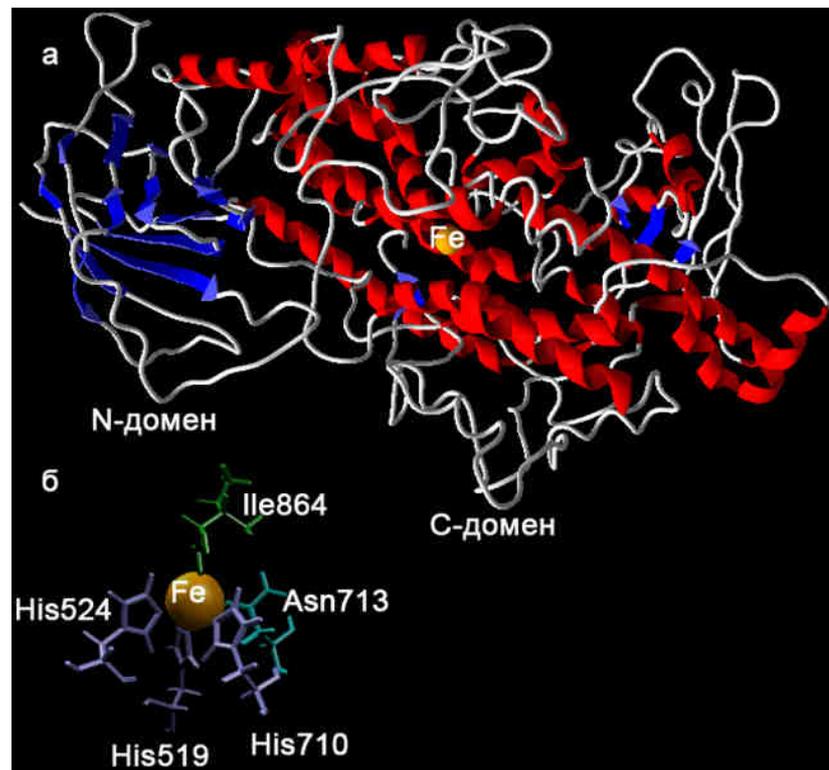


Рисунок 3. Пространственное разделение двух доменов позволяет предположить, что они выполняют разные функции в составе липоксигеназы: а – третичная структура фермента, б – расположение лигандов железа.

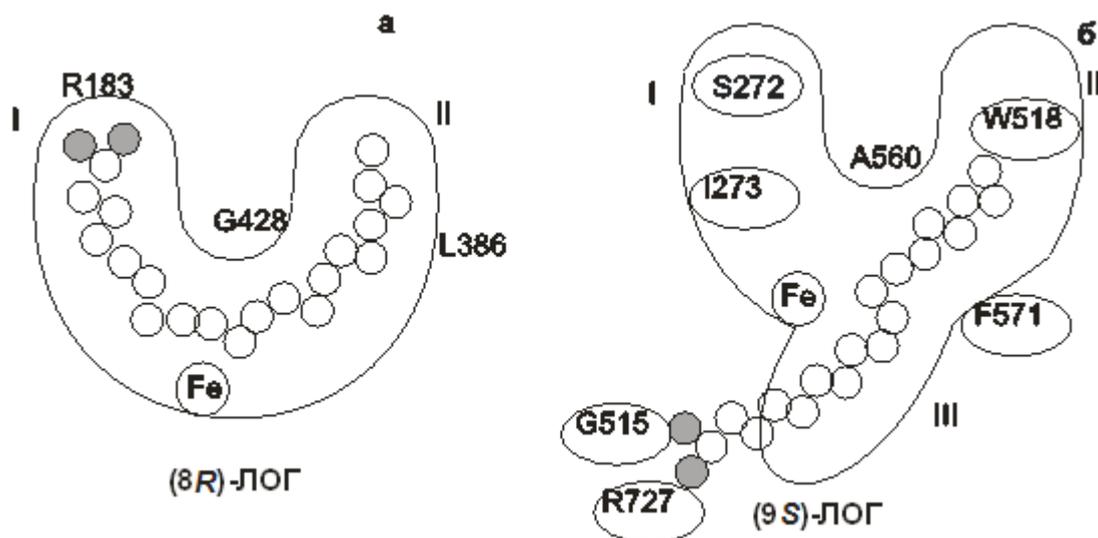


Рисунок 4. Модели позиционирования субстрата в активном центре липоксигеназ. а – «U»-образная модель (8R)-ЛОГ коралла, б – ZmLOX3. I – полость I, II – полость II, III-полость III.

При этом боковые группы Ile и Ser перегораживали проход в полость I, ограниченную с другой стороны приподнятым атомом железа. Полость II образована Gln513, Leu514, His517, Trp518, His522, Ala560, Leu565, Ile566, Phe571, Leu582, Ser585. Боковая группа Phe571 не позволяет алифатической части субстрата проникнуть глубже в полость II. Полость III, частично перекрывающаяся с полостью II, образована аминокислотными остатками Gln513, Leu514, His517, His522, Leu559, Ala560, Leu564, Phe571, Val575, Thr727, Gly765, Leu768, Ile769. При этом боковые группы аминокислот дна полости III смещены таким образом, что субстрат располагается ближе к атому железа. Таким образом, субстрат-связывающий центр ZmLOX3 имеет небольшой объем, что накладывает ограничения на конформацию субстрата при его позиционировании у атома железа. Для ZmLOX3 крайне важно позиционирование субстрата. ZmLOX3 имеет предположительно только один канал для проникновения субстрата, фланкированный аминокислотными остатками, образующими дно полости III (Рис. 4).

Благодаря результатам компьютерного моделирования были выбраны отдельные фрагменты С-концевого домена, отвечающего за проявление каталитической активности липоксигеназ. В основу первичной последовательности мини-липоксигеназы входят фрагменты альфа-спиралей, организующих внутреннюю поверхность субстрат-связывающего кармана. Дополнительные бета-структуры, отвечающие, по-видимому, за связывание фермента с мембраной были удалены.

Отправной точкой для конструирования мини-фермента являлась реконструкция его пространственной структуры. В последнее время в этом направлении достигнуты значительные успехи благодаря достижениям компьютерного моделирования. Для построения модели в настоящий момент достаточно наличие в банке данных пространственных структур белков, обладающих высокой гомологией к заданной аминокислотной последовательности. На основании третичной структуры алленоксидсинтазы *Arabidopsis thaliana*, полученной Ли с сотр. [17] методом экспериментального

рентгеноструктурного анализа, и наличия высокой степени гомологии между белками с помощью программы ESyPred3D [26] была построена пространственная структура аминокислотной последовательности алленоксидсинтазы LeAOS3 томата (Рис. 5) без дополнительных экспериментальных исследований. На основании третичной структуры липоксигеназы GmLOX3 сои, полученной [27] методом экспериментального рентгеноструктурного анализа, и наличия высокой степени гомологии между белками с помощью программы ESyPred3D [26] была построена пространственная структура аминокислотной последовательности липоксигеназы ZmLOX3 кукурузы (Рис. 6).

На основании полученных пространственных структур были выбраны участки последовательностей, максимально приближенных к каталитическому центру. В случае LeAOS3 были выбраны участки, пространственно приближенные к гему. В случае ZmLOX3 – участки, формирующие субстрат-связывающий карман.

Было учтено, что размер полученного мини-фермента не должен превышать 25 кДа, поскольку для метода ЯМР высокого разрешения основным ограничением применимости служит размер молекулярной системы.

Для конструирования mini-ZmLOX3 помимо получения пространственной структуры было проведено сопоставление первичной последовательности ZmLOX3 с описанными в литературе мини-формами липоксигеназ – *Anabaena* [28] – 773 а.к.о., *Cyanothece* [29] – 569 а.к.о., *Nostoc* [30]. Кроме того, описана укороченная форма липоксигеназы GmLOX1 сои, полученная путем обработки полноразмерного фермента пептидазой с образованием С-концевого и N-концевого доменов [31]. Липоксигеназную активность в данном случае проявлял исключительно С-концевой домен, который содержал атом негемового железа.

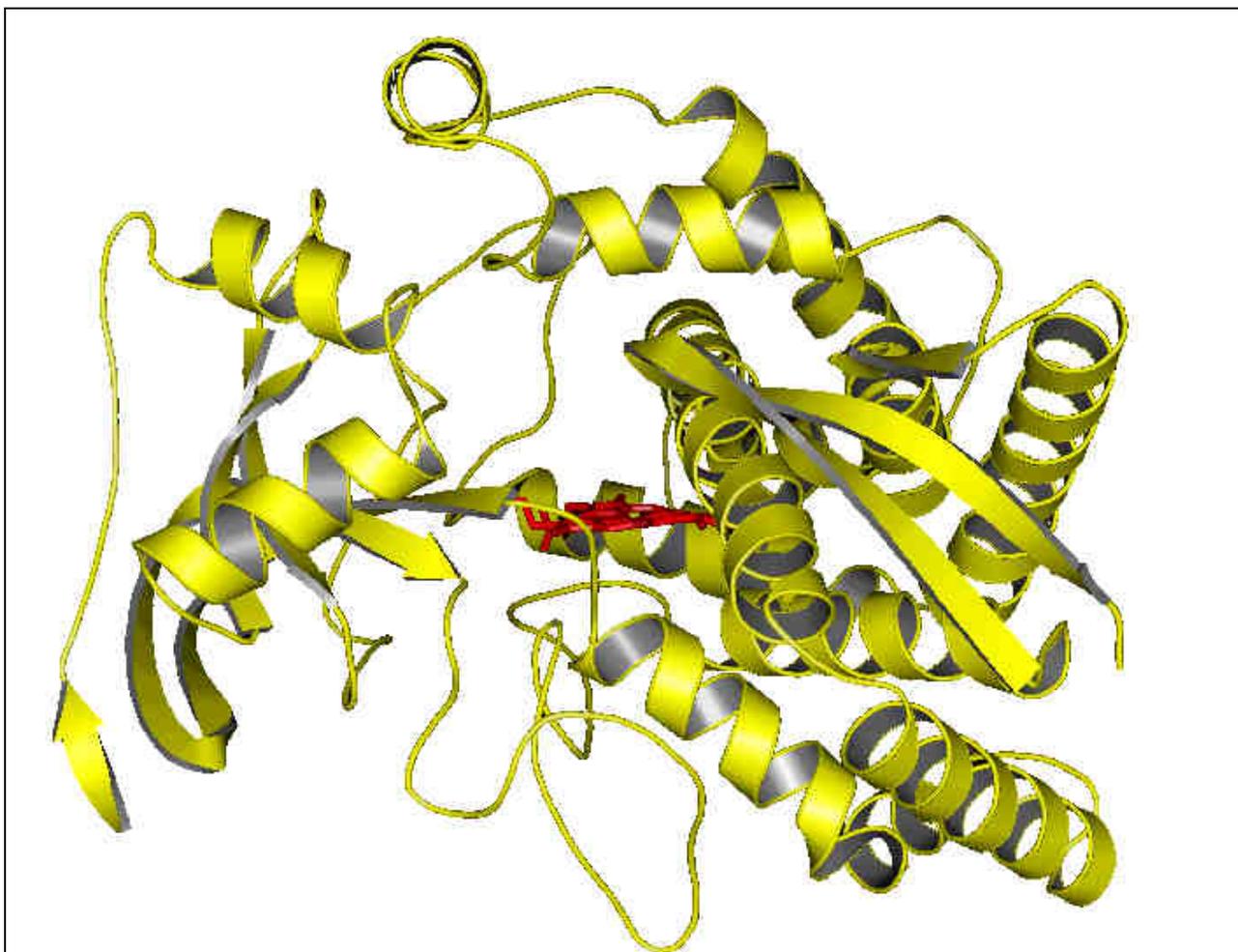


Рис. 5. Реконструированная структура полноразмерного фермента LeAOS3.

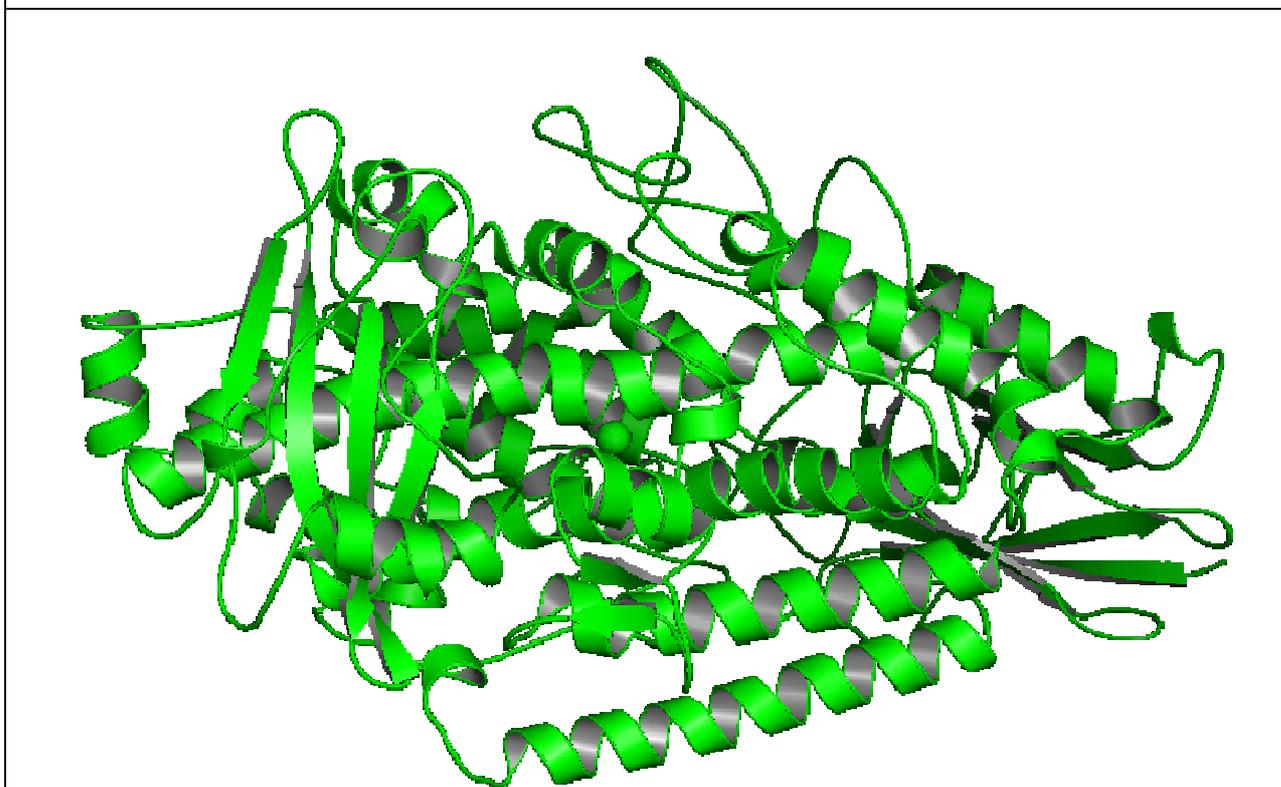


Рис. 6. Реконструированная структура полноразмерного фермента ZmLOX3.

Для создания mini-ZmLOX3 (Рис. 7) были использованы парные выравнивания первичных последовательностей с учетом их вторичной структуры и сопоставления третичных структур. При этом было отмечено, что наиболее часто в укороченных формах липоксигеназ отсутствуют β -структуры, характерные как для N-концевого домена, так и C-концевого домена. Мы предположили, что удаление N-концевого домена, а также β -структур, характерных для C-концевого домена, не приведет к потере каталитической активности фермента. Каталитически важные аминокислотные остатки находятся в составе α -спиралей, образующих субстрат-связывающий карман. В их число входят 3 из 4 лигандов негемового железа; четвертый лиганд находится на C-конце аминокислотной последовательности, образующей неупорядоченную структуру. Удаление аминокислотных остатков периферийных α -спиралей приведет к некоторому изменению конформации оставшихся структур. Одним из необходимых условий для сохранения каталитической активности является расстояние между лигандами негемового железа. Для сохранения данных расстояний использовались фрагменты неупорядоченной структуры, характерные для нативного фермента.

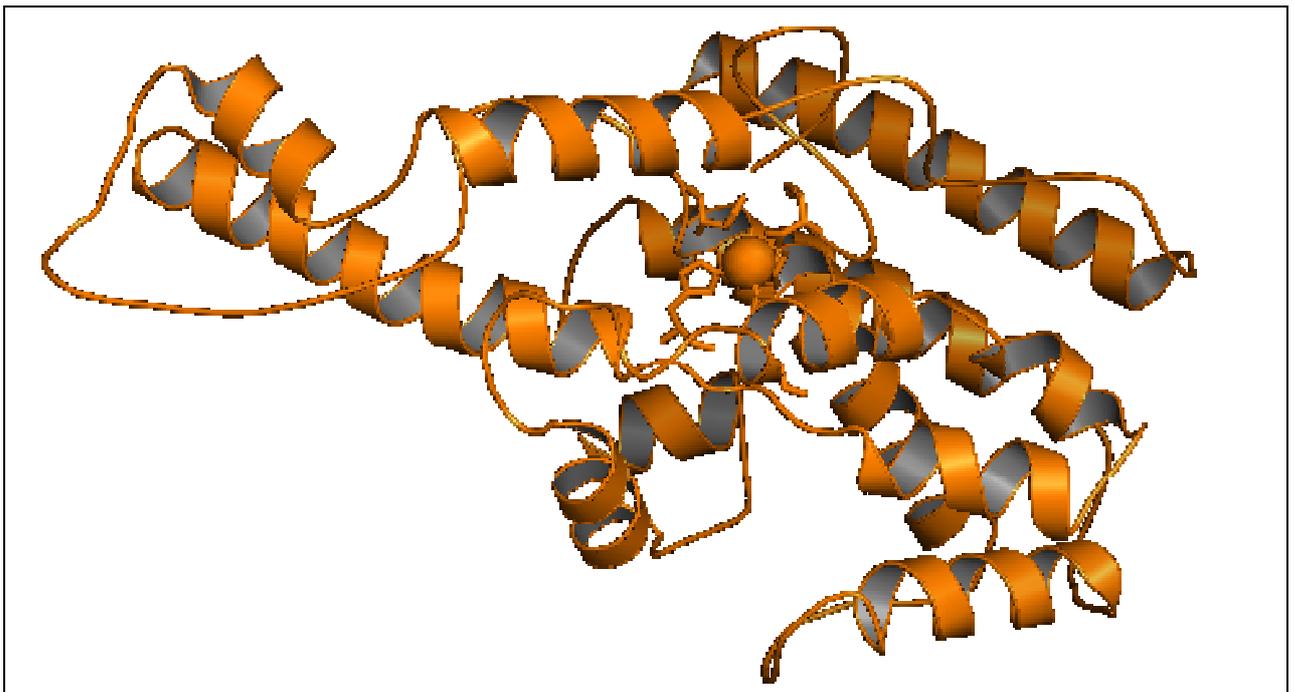
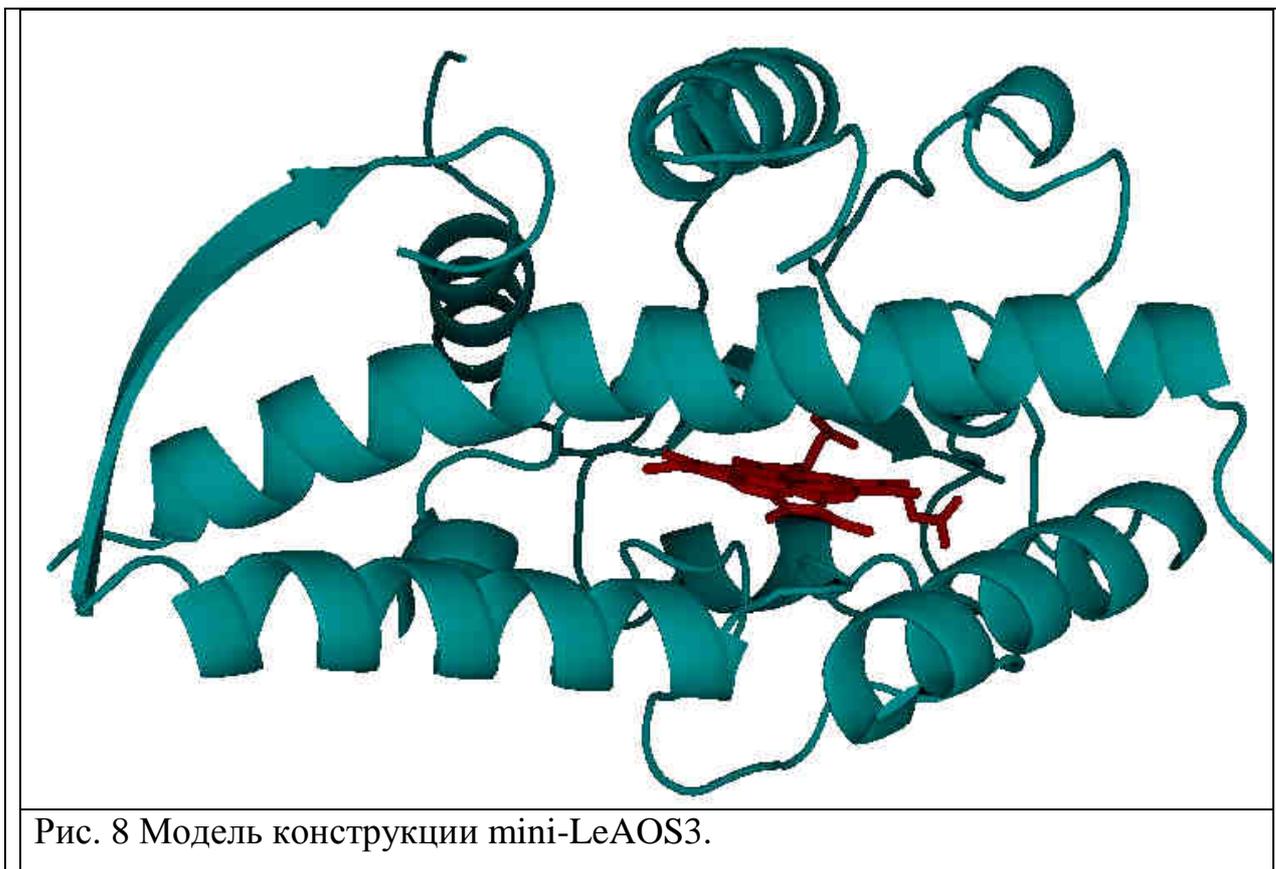


Рис. 7 Модель конструкции mini-ZmLOX3.



При конструировании mini-LeAOS3 (Рис. 8) были сохранены все необходимые для активности фермента участки полипептидной цепи. Однако гарантировать соответствующий фолдинг мини-фермента при этом не возможно.

Для получения генно-инженерных конструкций, кодирующих мини-ферменты, были сконструированы праймеры, комплементарные концевым участкам выбранных областей нативных генов (Таблица 1).

Полученные рекомбинантные плазмиды, содержащие целевые последовательности, были трансформированы в неэкспрессирующий штамм бактерии-хозяина *Escherichia coli* NovaBlue. Для получения рекомбинантного белка были получены штаммы-продуценты на основе *E. coli* Tuner(DE3)pLysS с помощью трансформации штамма рекомбинантными плазмидами pET23b(mini-LeAOS3) и pET32(mini-ZmLOX3). Проверку эффективности трансформации осуществляли с помощью ПЦР (Рис. 11).

В результате индукции синтеза рекомбинантного белка в клетках

продуцента были получены белки с молекулярными массами, которые соответствовали теоретически рассчитанным массам.

Таблица 1. Праймеры для конструирования мини-ферментов.

Mini- LeAOS3	ATGAGTGTTGGCCСТААТGGACC
	СТАGCTCCATТGATТGGTGCTGATGAA
	САATGTCCCTCCTGTAGACGCGGTTAG
	СТААСТАGATТGCATGACCTТGGAGTTAAAAGAG
	GATAGGTACATCAGGACTTTGAACCAAGC
	САТТТGACCAATACACGAAACCСТАAGG
	CCTAGCCTTAAACGGTTTGGAAATGGAAC
	CCTTAGGGTTTCGTGTATTGGTCAAATG
	GCTTGGTTCAAAGTCCTGATGTACCTATC
	CTCTTTTAACTCCAAGGTCATGCAATСТАGTTAG
	СТАACCGCGTCTACAGGAGGGACATTG
	TTCATCAGCACCAATCAATGGAGCTAG
	Mini- ZmLOX3
CTCGACGCCGCTGGACGCCG	
AATTCGAGCTCCGTTCGAACGCCGGCGTCCAGCG	
TGGACGCCGGCGTTCGACGGAGCTCGAATTCGG	
GTACAAGAGCTGGAAGGACGCGCCCTGGTGG	
GGGCGCGTCCTTCCAGCTCTTGTACACCACGGAGGA	
GCGGGGTACCTCGGCCCGCCGAGTTCCCC	
GGCGGGGCCGAGGTACCCCGCGTACGGGTTACTG	

Процедуры получения и очистки тотально обогащенных по ядрам ^{15}N инженерных форм мини-ферментов были составлены нами на основе общепринятых протоколов. Было учтено, что необходимо обеспечить клеткам бактериального продуцента источник меченого и лишить их источника немеченого азота. Для этого клетки бактериального продуцента выращивали в минеральной среде M9 [32], которая содержит 0.6 % Na_2HPO_4 , 0.3 % KH_2PO_4 , 0.05 % NaCl , 0.1 % $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ (Sigma, США). С помощью NaOH

в среде доводили рН до 7.4, стерилизовали ее автоклавированием и добавляли предварительно автоклавированные по отдельности 2 мМ MgSO₄, 0.1 мМ CaCl₂. В качестве источника углерода к среде добавляли глюкозу.

Тотально обогащенные по ядрам ¹⁵N препараты всех мини-ферментов получали по одному протоколу, описанному ниже. Культуру клеток *E. coli* Tuner(DE3)pLysS, несущую рекомбинантную плазмиду (5-10 мл), выращивали в среде M9, содержащей ампициллин и хлорамфеникол, при 32 °С и умеренной аэрации (180 об/мин) до стационарной фазы роста, после чего культурой инокулировали 25 мл свежей среды M9 и выращивали при интенсивной аэрации (250 об/мин, 32 °С) до достижения культурой значения оптической плотности OD₆₀₀ 2.0-2.5. Оптическую плотность измеряли с помощью спектрофотометра Lambda 25 (Perkin-Elmer, США). Культуру инокулировали в свежую среду M9 и выращивали при 32 °С и интенсивной аэрации (250 об/мин) до достижения значения OD₆₀₀ 0.8-1.0, после чего охлаждали до 20 °С. К охлажденной культуре добавляли индуктор синтеза белков – ИПТГ из расчета 115 мг/л – и (в случае mini-LeAOS3) предшественник гема – δ-аминолевулиновую кислоту – из расчета 50 мг/л. Индуцированную культуру инкубировали в течение 8-14 часов при 180 об/мин и 20 °С.

Все операции по очистке рекомбинантных мини-ферментов проводили на льду. Исходя из предполагаемых свойств целевого мини-фермента, для очистки отбирали гидрофобные белки, ассоциированные с мембранной фракцией.

Рекомбинантные мини-ферменты очищали с помощью катионообменной и металлоаффинной хроматографий на колонках Bio-Scale Mini Profinity UnoSphereS и IMAC 5 мл, соответственно, в хроматографической системе BioLogic LP (Bio-Rad, США) по протоколу производителя с некоторыми модификациями.

Клетки осаждали центрифугированием. Осадок суспендировали в 40 мл лизирующего буфера (50 мМ трис-ацетатного буфера (рН 5.6), 100 мМ

NaCl, 0,3 % полиоксиэтилен-10-тридецилэфира) и механически разрушали с помощью системы French Press Cell Disrupter (Thermo Scientific, США). Полученный лизат осветляли центрифугированием (13500 об/мин, 20 мин, 4 °С). Для очистки использовали осветленный супернатант. Колонку UnoSphereS уравнивали лизирующим буфером. На сорбент наносили лизат, отфильтрованный через мембрану 0.22 мкм. О прохождении белков через колонку судили по изменению оптической плотности растворов в хроматографической системе при 280 нм. Сорбент промывали лизирующим буфером до тех пор, пока оптическая плотность не упала до устойчивого минимума, после чего элюировали тем же буфером, содержащим 700 mM NaCl. Элюент наносили на колонку IMAC, промывали отмывающим буфером (50 mM Na-фосфатного буфера (pH 7.0), 100 mM NaCl, 3 mM гистидина). Белок элюировали из сорбента элюирующим буфером (50 mM Na-фосфатного буфера (pH 7.0), 30 mM гистидина). Полученную фракцию элюента концентрировали, пропуская через центрифужный фильтр Amicon Ultra 10k (Millipore).

С целью повышения эффективности проводимых измерений проводили тестовые ЯМР эксперименты на образцах, близких по молекулярной массе к целевому белку. Были проведены работы по адаптации ЯМР-спектрометра высокого разрешения AVANCEITM-500 (Bruker, Германия) под исследования белковых препаратов. Особенностью работы с белками является то, что спектры ЯМР для подобных молекулярных структур, как правило, сильно перегружены сигналами, которые могут перекрываться друг с другом и достаточно сильно отличаться между собой по интенсивности, в силу различной подвижности разных участков белковой цепи. Кроме того, для экспериментов используют растворы белков в водных буферных растворах, что приводит к необходимости борьбы с сильными сигналами от протонов воды и компонентов буфера, которые накладываются на сигналы от протонов белка. Во избежание этого используются рекомбинантные белки, обогащенные по ядрам ^{13}C и ^{15}N и дейтерированный буфер. Записывают

серию трехмерных спектров, в которых возбуждаемая намагниченность выборочно передается с протонов на ядро ^{15}N , затем на определенную группу углерода ^{13}C и обратно на протоны. Такой подход позволяет «высвечивать» из всех возможных ядер только определенную группу. Однако на этапе оптимизации метода использование обогащения по ядрам ^{13}C и ^{15}N и дейтерированного буфера представляется нецелесообразным в силу дороговизны. Таким образом, возникает необходимость подбора и оптимизации импульсных последовательностей ЯМР для работы с белками с естественным содержанием изотопов ^{13}C и ^{15}N и обычным, не дейтерированным буферным раствором.

В целях проверки возможностей спектрометра для работы с целевыми объектами был выбран раствор тестового белка ВРТИ (Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor, ингибитор трипсина, ВРТИ (Sigma)) с естественным содержанием по ядрам ^{13}C и ^{15}N и молекулярной массой 6,5кДа, в водном (соотношение $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$, 90% к 10%) буфере Na-Phosphate 50 мМ, рН 7.2. Этот белок является удобным объектом для экспериментов ЯМР даже с естественным содержанием ядер ^{13}C и ^{15}N [33, 34]. Прделанная работа включала в себя тестирование чувствительности аппаратуры, подбора и оптимизации импульсных последовательностей для работы с белками с естественным содержанием изотопов ^{13}C и ^{15}N и недейтерированным буферным раствором, выбор оптимальной методики одновременного селективного подавления спектральных линий от протонов воды и протонов буфера и оптимизацию температурного режима работы спектрометра. Основные проблемы возникли с двумя последними факторами. Импульсная последовательность, входящая в стандартную комплектацию спектрометра, которая используется для подавления сигналов от протонов воды и протонов буфера, оказалась неэффективной. Нами была выбрана последовательность NOESY [35], в которой использована методика селективного подавления сигналов в спектре с помощью подбора формы импульса [36]. Для эффективного подавления сигналов в протонов воды и буфера нами была

проведена замена синусоидального импульса на прямоугольный, подобрана огибающая форма импульса и его фаза. Было найдено компромиссное решение, в котором полученная форма и мощность импульса подавляла достаточно узкий спектральный диапазон и наблюдалась минимальная потеря интенсивности спектральных линий от протонов белка.

На фоне подавленных «паразитных» сигналов в спектрах белка были обнаружены артефактные сателлитные линии, которые оказались следствием периодического температурного дрейфа воздуха в помещении порядка 0.1°C . Выполнены работы по стабилизации температуры в пределах 0.02°C . Оптимизация температурного режима в пределах 0.02°C позволила избавиться от артефактных сателлитных линий вдоль главной диагонали. Комплекс выполненных работ позволил существенно улучшить качество спектров (Рис. 9) и за тот же временной интервал записи спектра добиться более высокой чувствительности спектрометра.

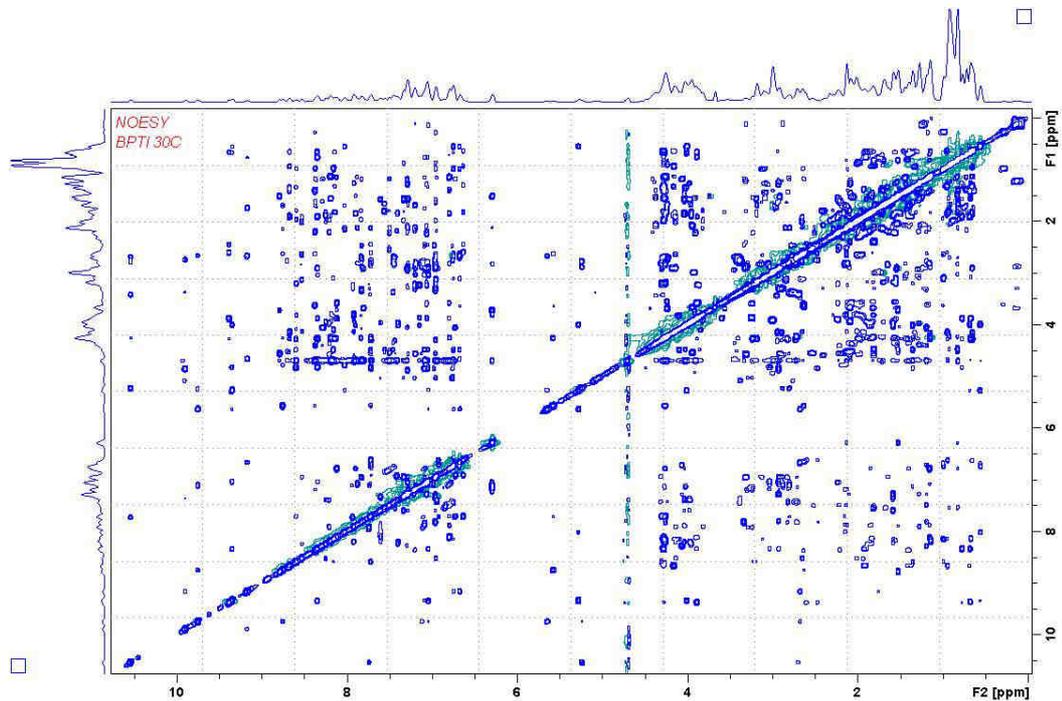


Рис. 9. Двухмерный NOESY спектр ЯМР белка ВРТИ с модифицированной формой селективного импульса и со строго стабилизированной температурой образца, который демонстрирует хорошее подавление сигналов протонов воды и буфера, и отсутствие артефактных сигналов в спектре.

Затем проводили дальнейшую адаптацию методик эксперимента ЯМР высокого разрешения для получения информации о структуре, динамике и межмолекулярных взаимодействиях на тестовых белковых образцах. В выполняемом проекте объектами исследования являются модельные искусственные белки с молекулярной массой 25 кДа. На Рис. 10 показан спектр ^1H ЯМР белка ВРТИ с использованием подавления сигналов протонов воды по методике предварительного насыщения. Температура раствора белка во время записи спектра была $+30^\circ\text{C}$. На спектре видны сигналы от протонов белка ВРТИ на фоне достаточно сильных интенсивных сигналов от протонов воды δ 4.71 м.д. и протонов буфера δ 3.68 м.д. Видно, что данная импульсная последовательность позволила получить приемлемый спектр. Далее были записаны двумерные спектры *cosy* [37] и *tocsy* [38] (Рис. 11 и Рис. 12, соответственно). При условии увеличения времени записи спектра можно добиться более высокого отношения сигнал/шум. Необходимо отметить, что если разрешение для высокопольной области спектра в области от 5 до 10.5 м.д. хорошее, то для низкопольной области спектра наблюдается достаточно сильное перекрытие спектральных линий. Также можно отметить, что в случае *tocsy* спектра проявилась интенсивная линия от протонов буфера в области δ 3.68 м.д., что, безусловно, привело к ухудшению отношения сигнал/шум. Корреляционные спектры, такие как *cosy* и *tocsy*, дают информацию о наличии корреляции одних ядер с другими. Такая информация на этапе отнесения линий не является количественной, и не столь критична к искажениям в спектре. На Рис. 13 приведен спектр *poesy* белка ВРТИ со следующими параметрами спектра: значение релаксационной задержки d_1 2 с; время смешивания 120 мс; число точек в спектре 1024x512; число накоплений 16; длительность 90° импульса 9.72 мкс; общее время записи спектра составило 5.5 часов. Все остальные последующие спектры *poesy*, обсуждаемые ниже в данном разделе, записывались с аналогичными настройками.

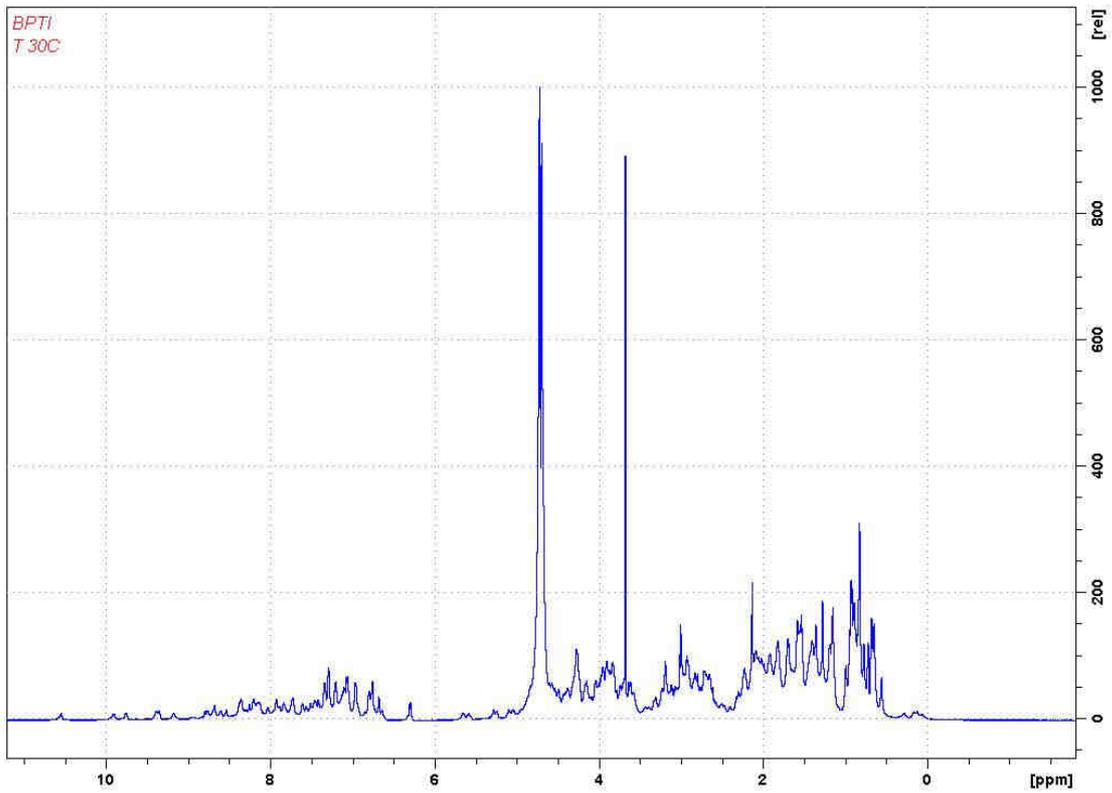


Рис. 10. Спектр ЯМР ^1H белка ВРТІ с подавлением воды по методу предварительного насыщения. Видны интенсивная линия протонов буфера и не полностью подавленная линия протонов воды.

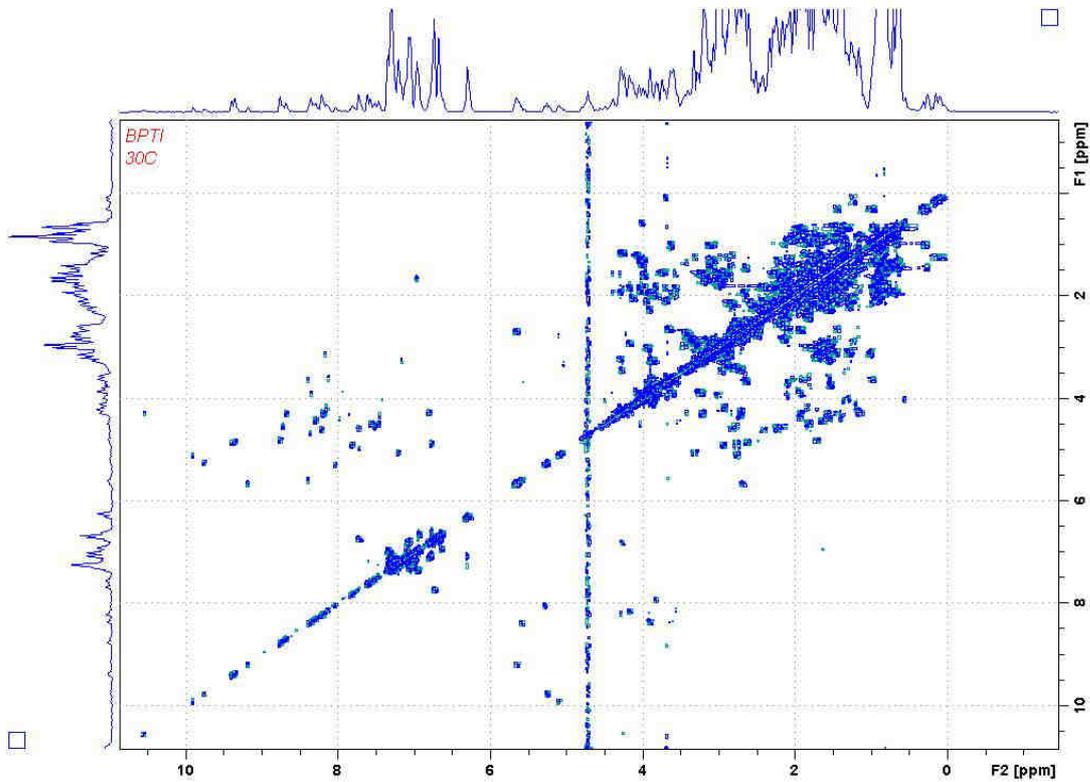


Рис. 11. Двухмерный ЯМР cosy спектр белка ВРТІ.

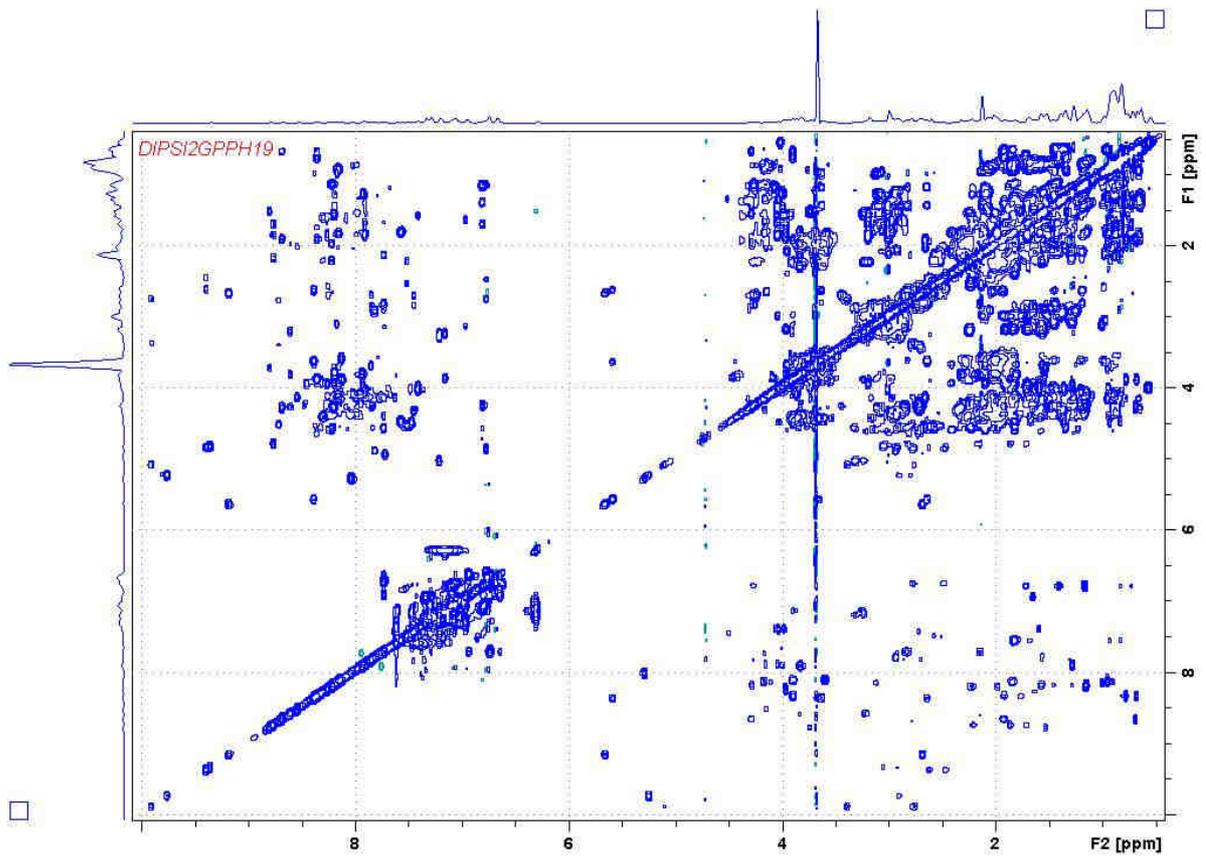


Рис. 12. Двухмерный ЯМР tocsy спектр белка ВРТИ.

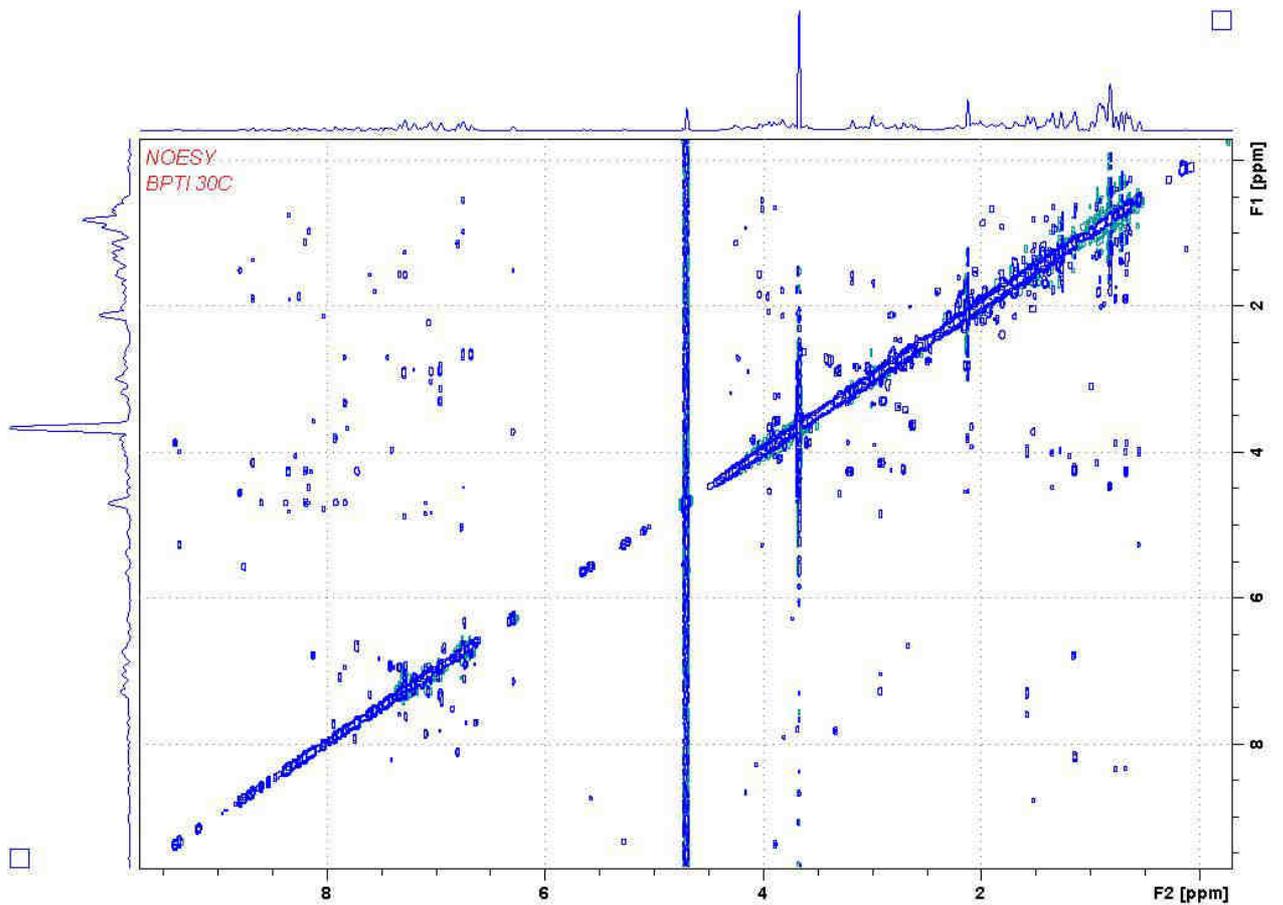


Рис. 13. Двухмерный ЯМР noesy спектр белка ВРТИ.

Как и в случае со спектром *tocsy* аналогично наблюдается интенсивная линия от протонов буфера в области δ 3.68 м.д., которая существенно ухудшает чувствительность спектра. Если в случае с *tocsy* спектром можно смириться с потерей чувствительности спектра и ухудшением соотношения сигнал/шум, то в *poesy* спектре такая ситуация может оказаться критической. Поэтому нами были предприняты попытки подавления спектральных линий одновременно от протонов воды и протонов буфера.

Для этого была выбрана *poesy* последовательность [35], в которой использована методика селективного подавления сигналов в спектре с помощью подбора формы импульса [36]. Особенностью данного метода является возможность путем подбора формы и фазы импульса одновременно подавлять как линию от протонов воды, так и линию от протонов буфера.

На Рис. 14 показаны два одномерных протонных спектра, один записан с подавлением воды методом предварительного насыщения (красный спектр), а второй по описанной выше методике с подобранной формой селективного импульса (синий спектр). Нежелательные сигналы от воды и буфера практически полностью подавлены, а потеря в интенсивности сигналов от протонов белка получилась приемлемая.

На Рис. 15 представлен полный двумерный *poesy* спектр белка ВРТИ, записанный с применением описанного выше метода селективного подавления. Можно наблюдать хороший результат подавления протонов воды и буфера. В результате полученный спектр имеет лучшее соотношение сигнал/шум, чем демонстрируемый ранее на Рис. 13, при одинаковых настройках параметров записи спектра и, соответственно, с одинаковым временем, затраченным на его запись. В результате удалось подбором формы и фазы селективных импульсов подавить нежелательные сигналы от протонов воды и буфера. Оптимизация температурного режима позволило избавиться от артефактных сателлитных линий вдоль главной диагонали. Все это в целом позволило качественно улучшить спектр и за тот же временной интервал записи спектра получить более высокую чувствительность.

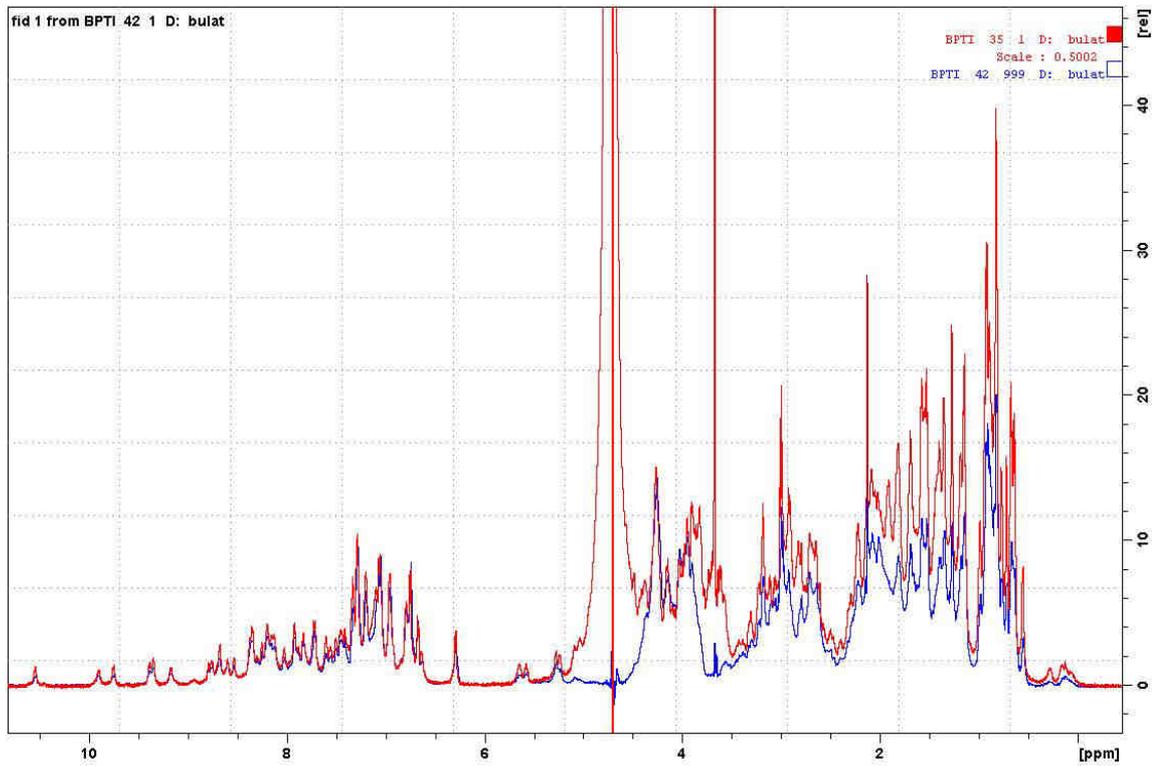


Рис. 14. Сравнение одномерных спектров ЯМР ^1H полученных подавление воды методом предварительного насыщения (красный спектр) и методом селективного возбуждения особой формы селективного импульса (синий спектр).

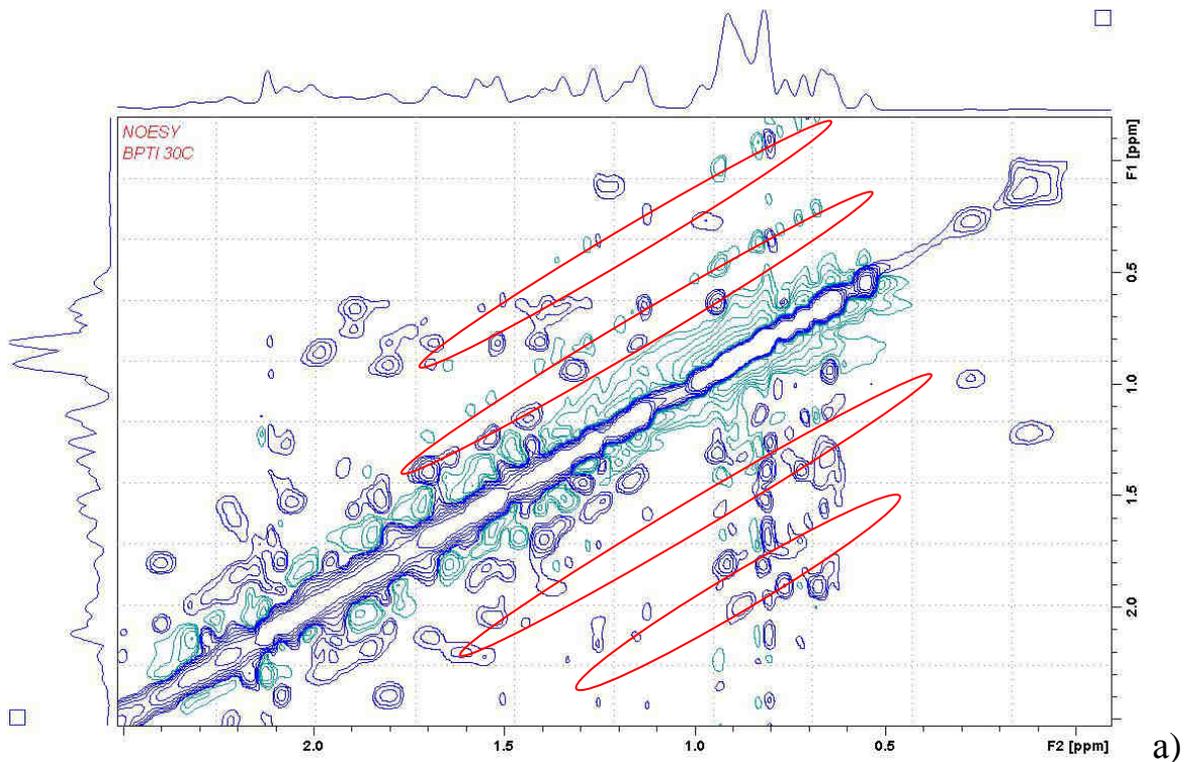


Рис. 15. Двухмерный ЯМР спектр noesy белка ВРТИ – выделены артефактные сигналы вследствие нестабильности температуры.

Все представленные наработки были использованы для получения спектров ЯМР на обогащенном по ^{13}C и ^{15}N мини-ферменте, моделирующем каталитический центр алленоксидсинтазы LeAOS3 томата, с последующим отнесением сигналов от ядер основной полипептидной цепи фермента.

Анализ вторичной структуры целевых белков проводили в TENSOR 27 ИК-Фурье-спектрометре (Bruker, Германия). Спектры были записаны с $4,0\text{ см}^{-1}$ разрешением и скорректированы для паров воды и буфера. Были использованы кюветы CaF_2 с толщиной слоя 10мк. Для каждого измерения были усреднены результаты 128 сканирований. Из-за высокого уровня шумов приняли сглаживание по 21 точкам. Раствор белка в 20 мМ Na-фосфатном буфере + 0.05 % NaN_3 , концентрация белка 1,48 мг/мл.

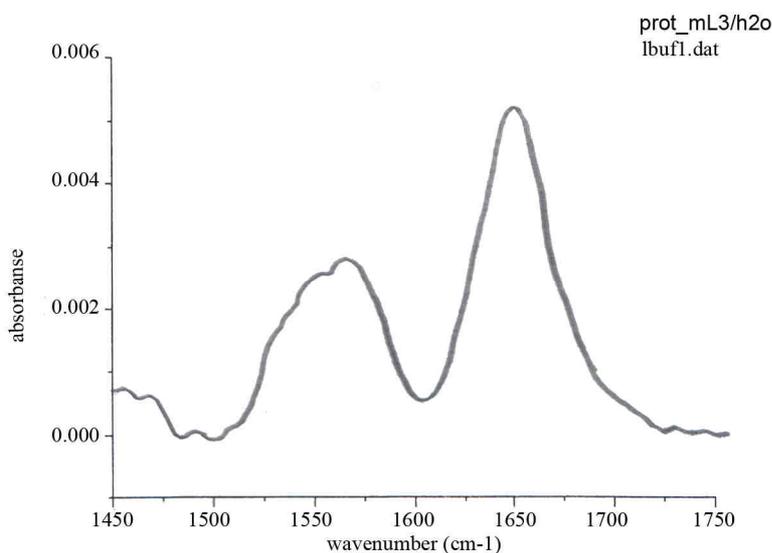


Рис. 16. ИК-спектр белка.

На рисунке 16 представлены спектр буфера после вычитания воды и буфера. Полосы вблизи 1518 и 1608 см^{-1} обусловлены поглощением гистидина. Интенсивность в максимуме амид 1 белка составляет 0,005 ед. оптической плотности. Если воспользоваться калибровочным графиком, составленным на основе измерений спектров лизоцима различной концентрации, то данная оптическая плотность соответствует концентрации белка 1,4 мг/мл, что близко заявленной.

Высокая степень сглаживания размывает детали спектра. Поэтому выполнить разложение на компоненты не представляется возможным. Качественно оценить характер вторичной структуры можно, визуально сопоставив спектр мини-фермента со спектрами других белков (Рис. 17).

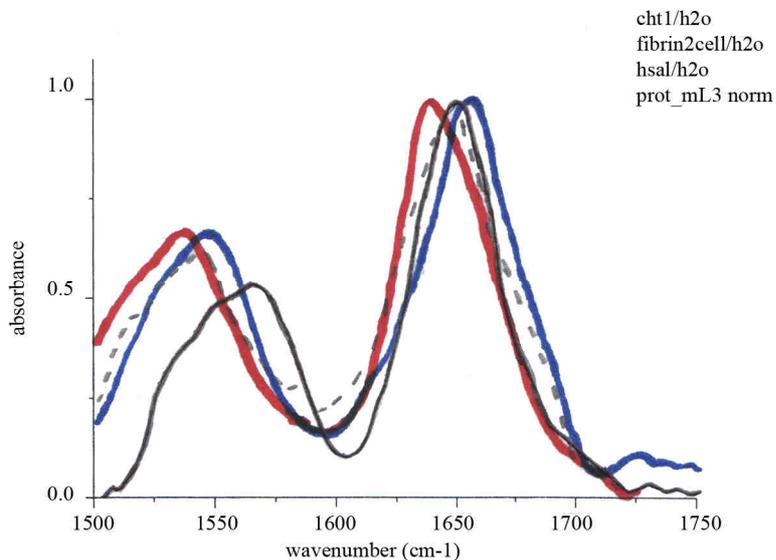


Рис. 17. Спектры поглощения различных белков в области амид 1. Красным цветом отмечен химотрипсин, черными штрихами – фибрин, синим – САЧ, черным – мини-фермент.

В области амид 2 максимумы всех белков группируются вблизи 1540 см^{-1} , тогда как у фермента превалирует максимум на 156 см^{-1} , соответствующий поглощению карбоксилов в Glu, т.е. первичная структура фермента относительно обогащена этими остатками. В области амид 1 максимум фермента приходится на $1649\text{-}1650\text{ см}^{-1}$, полоса более узкая, чем у других белков, что свидетельствует о более однородной структуре. На рисунке 2 представлены спектры химотрипсина – преимущественно β -структурного белка, САЧ – α -спирального белка и фибрина – также содержащего большое число α -спиралей, но в отличие от остальных не являющимся глобулярным. Его α -спирали более гидратированы, вследствие чего максимум поглощения смещен в сторону низких частот по сравнению с САЧ. Очевидно, что спектр мини-фермента в большей степени коррелирует

со спектром именно фибрина, но в отличие от последнего, не содержит (или очень мало) вклада со стороны β -структур и нерегулярных структур (random, β -turn).

С учетом неопределенности, вносимой вычитанием поглощения компонентов сложного буфера, спектр мини-фермента соответствует спектру преимущественно α -спирального белка с высокой доступностью пептидных групп в воде.

Была проанализирована каталитическая активность мини-фермента, моделирующего каталитический центр алленоксидсинтазы LeAOS3 томата. Нативный фермент катализирует превращение 9-гидроперекиси линолевой кислоты (9-ГПОД) в короткоживущую окись аллена, что можно наблюдать по падению оптической плотности реакционной смеси при длине волны 235 нм, характерной для 9-ГПОД, с помощью двухлучевого сканирующего термостатируемого спектрофотометра Lambda 25 (Perkin Elmer, США). Аналогичным образом можно протестировать наличие/отсутствие каталитической активности мини-фермента mini-LeAOS3. Первичные эксперименты показали наличие каталитической активности мини-фермента mini-LeAOS3 в реакционной смеси, содержащей 100 мкг 9-ГПОД, хотя и очень низкой.

Мы проанализировали продукты инкубаций mini-LeAOS3 с 9-гидроперекисью линолевой кислоты и сравнили их с таковыми цитохрома С (Рис. 18). Цитохром С является классической монооксигеназой P450, а не ферментом CYP74, и инкубация с его с гидроперекисью линолевой кислоты изначально рассматривалась как своего рода контроль на пассивное участие гема в превращении субстрата. Если рассматривать с этой точки зрения, можно сказать следующее. Хроматограммы продуктов инкубаций являются сходными, но не идентичными. Тот факт, что мини-фермент, составляющий менее половины нативного фермента, способен удерживать в своем составе гем, уже заслуживает внимания. Однако в этих хроматограммах есть и другие интересные моменты. Во-первых, из хроматограммы по полному

ионному току видно, что в результате инкубации гидроперекиси с цитохромом С весь субстрат оказывается превращенным. Мини-фермент обладает гораздо меньшей каталитической активностью, на что указывает остаток гидроперекиси. Различаются соотношения определенных соединений, и вопрос о специфичности образования тех или иных продуктов остается открытым. Предполагаемое ферментативное превращение субстрата приводит к образованию нескольких продуктов, появление которых можно объяснить следующей схемой. После образования эпоксиаллильного радикала процесс превращения может пойти по следующим двум направлениям: при потере протона образуется 9,14-дигидрокси-кислота, а при присоединении гидроксильного радикала – 9,10-эпокси-13-гидрокси-кислота, которая в результате восстановления дает 9,13-дигидрокси-кислоту (Рис. 19).

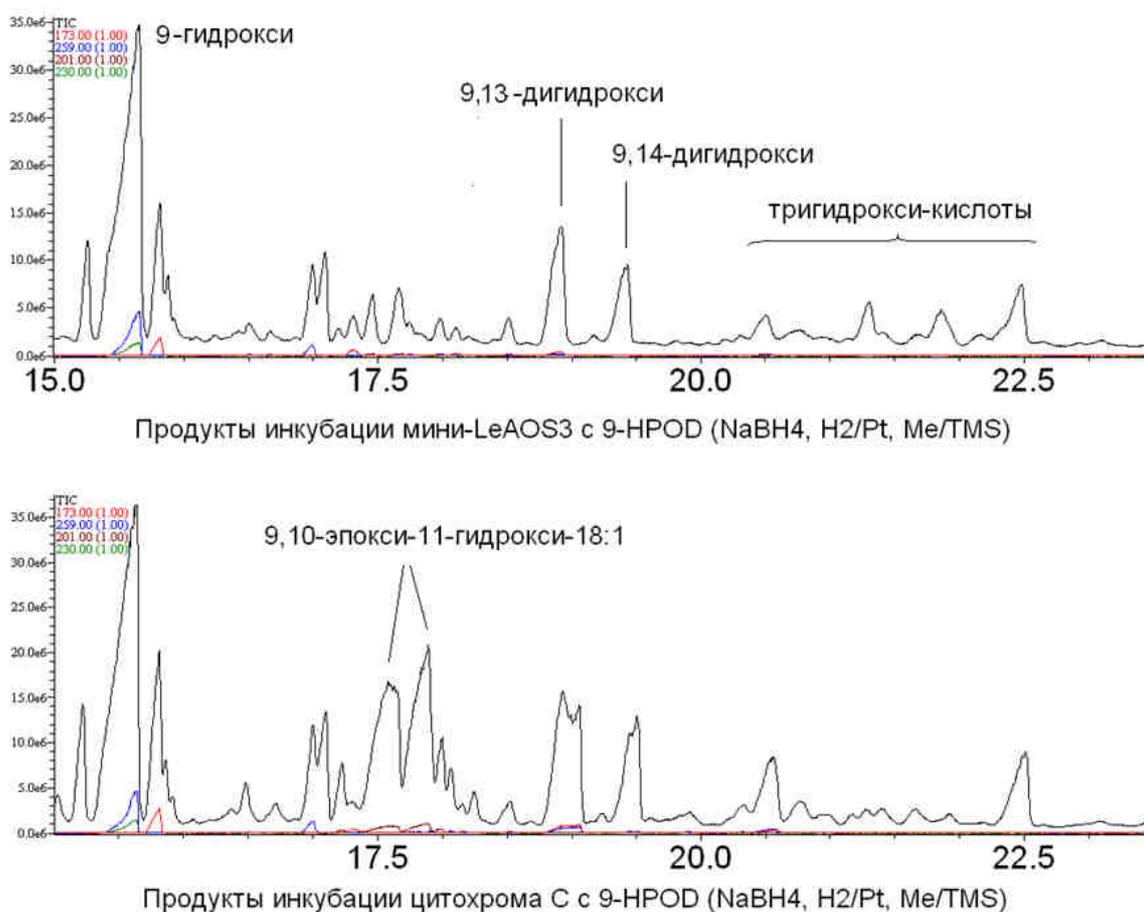


Рис. 18. Хроматограммы продуктов инкубаций мини-LeAOS3 и цитохрома С с (9S)-ГПОД.

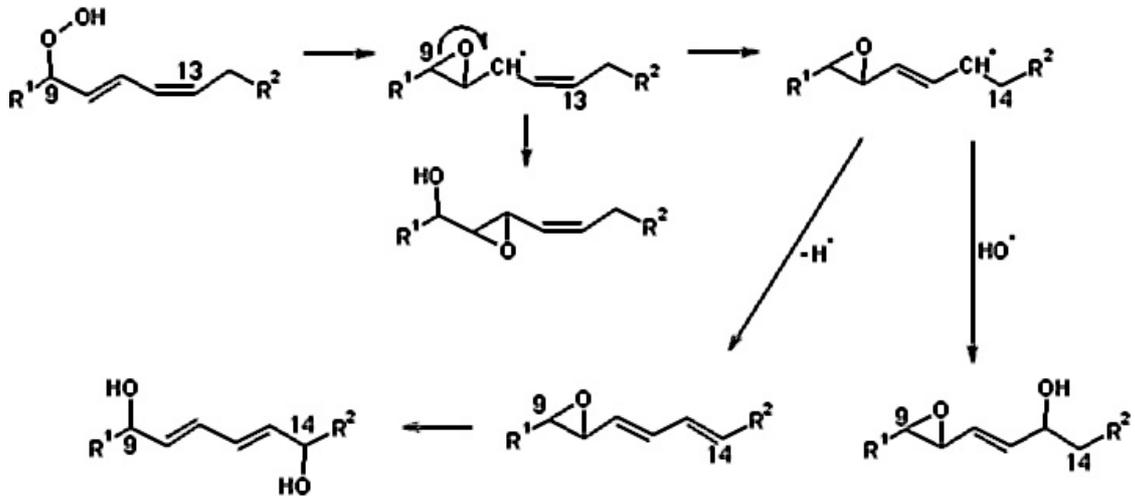


Рис. 19. Схема образования эпоксиалколей при участии мини-LeAOS3.

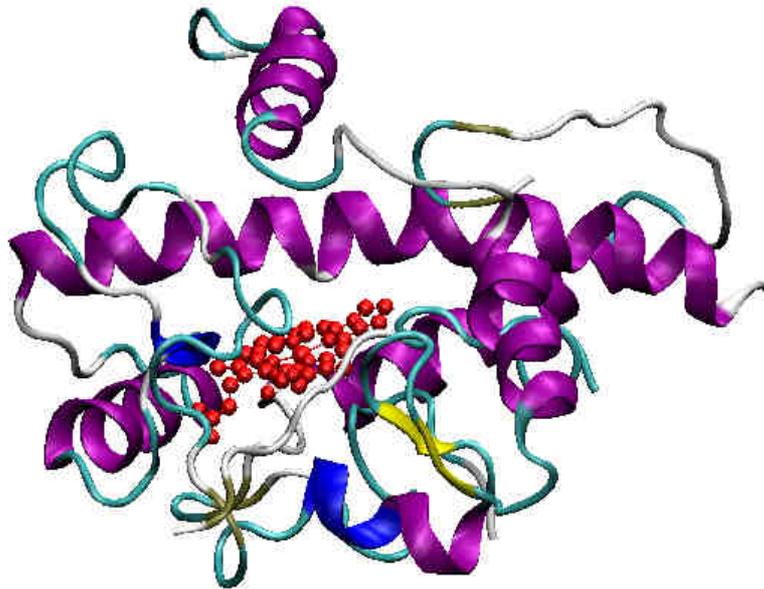


Рис. 20. Вторичная структура мини-фермента. Гем показан красным цветом.

Структура мини-фермента (MF) получена из модельного полного фермента – алленоксидсинтазы LeAOS3 томата (исходный pdb файл LeAOS3.pdb) – в результате отсечения аминокислотных остатков с номерами 26-50, 75-87, 152-205, 227-277, 317-353, 371-425 и сшивки оставшихся аминокислотных остатков в заданной последовательности. Полученная структура фермента была оптимизирована методом минимизации полной энергии белка с использованием метода молекулярной механики с использованием силовых полей AMBER99 [39]. Структура мини-фермента показана на Рис. 20.

Структура субстрата – (9S)-гидроперекиси α -линоленовой кислоты – была сконструирована с помощью программы HyperChem [40] и оптимизирована с помощью полуэмпирического метода AM1 [41]. Общий заряд субстрата равен нулю.

В настоящее время известно несколько десятков программ, позволяющих исследовать взаимодействие белков с лигандами методом докинга. В данной работе для исследования взаимодействия мини-фермента с субстратом был использован комплекс программ AutoDockTools-1.5.4, AutoGrid4, AutoDock 4.2 [42].

Для того чтобы ускорить расчеты энергии взаимодействия лиганда с макромолекулой, программа AutoDock использует трехмерную пространственную решетку, которая строится с помощью программы AutoGrid. Каждой точке пространственной решетки назначается потенциал, равный энергии взаимодействия тестового или пробного атома с атомами макромолекулы. Таких решеток строится несколько для каждого типа взаимодействия (электростатического, сольватационного и Ван-дер-Ваальсового). Для того чтобы описать Ван-дер-Ваальсовое взаимодействие строятся решетки для каждого типа атома лиганда. Такое предварительное создание решетки потенциалов позволяет значительно ускорить процесс расчета. Центр решетки может быть установлен в любой точке макромолекулы. Размер шага решетки может варьироваться в диапазоне от

0.2 до 1 Å. В данном случае был использован метод последовательного приближения, то есть было выполнено 3 расчета с разным шагом решетки (0.9 Å, 0.5 Å и 0.3 Å), что позволяет последовательно улучшать точность описания потенциалов без потери общности решения. Центр решетки был установлен на атоме железа.

Программа AutoDock использует Lamarckian genetic algorithm (LGA) [9] для поиска конфигурации протеин-лигандного комплекса с минимальной свободной энергией. Этот алгоритм начинает работу со случайного расположения популяции молекул лиганда в некоторых случайных точках пространства на построенной решетке. Конформация лиганда также выбирается случайной. С использованием алгоритма Монте-Карло производятся изменения в ориентации, положении и конформации лиганда и производится расчет энергии белок-лигандного взаимодействия. Если энергия взаимодействия в новой точке пространства более отрицательна чем энергия в предыдущей точке, то новая конформация принимается как более выгодная. После многократного повторения процедуры в результате одного расчета определяется одна структура комплекса белок-лиганд, которая определяется программой как наиболее энергетически выгодный комплекс. Для того чтобы провести статистический анализ полученных результатов поиск производят несколько раз.

Расчет полной энергии взаимодействия осуществляется с учетом электростатических, Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий, водородных связей, эффекта сольватации и торсионной энтропии.

$$\Delta G = \Delta G_{vdw} + \Delta G_{hbond} + \Delta G_{elec} + \Delta G_{tor} + \Delta G_{sol}$$

где ΔG_{vdw} – энергия Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий, ΔG_{hbond} – энергия водородных связей, ΔG_{elec} – электростатическое взаимодействие, ΔG_{sol} – энергия сольватации, ΔG_{tor} – вклад, оценивающий торсионную энтропию.

Белок рассматривается как жесткая структура, в то время как в субстрате разрешено вращение вокруг ординарных связей.

Для поиска энергетически выгодных структур, образованных ферментом и субстратом, был применен метод последовательных приближений.

Прежде всего, трехмерная решетка была построена таким образом, чтобы центр решетки совпадал с геометрическим центром белка, шаг решетки равен 0.9 \AA , а размер решетки был подобран таким образом, чтобы решетка покрывала весь белок (Вариант L). В этом случае лиганд имел доступ к любой точке поверхности белка, и расчет производился без дополнительных ограничений. Затем шаг решетки был уменьшен до 0.5 \AA , и решетка была центрирована на атоме железа (вариант M), третий вариант моделирования был проведен с решеткой 0.3 \AA с центром на атоме железа (вариант S). Для каждого варианта моделирования было проведено 256 расчетов, в результате каждого была выбрана одна наиболее энергетически выгодная структура. Сравнительный анализ 256 полученных комплексов позволяет определить лучшее решение, то есть комплекс с максимальной энергией взаимодействия. Одна из полученных структур в качестве примера показана на Рис. 21.

Анализ полученных результатов проводился по следующим характеристикам: средняя энергия взаимодействия белка с лигандом, максимальная энергия взаимодействия, константа диссоциации комплекса и вероятность образования комплекса.

Для анализа полученных комплексов была разработана специальная программа, которая позволяет определять расположение центра масс молекулы лиганда, ориентацию лиганда относительно белка и проанализировать те остатки белка, которые наиболее часто взаимодействуют с лигандом.

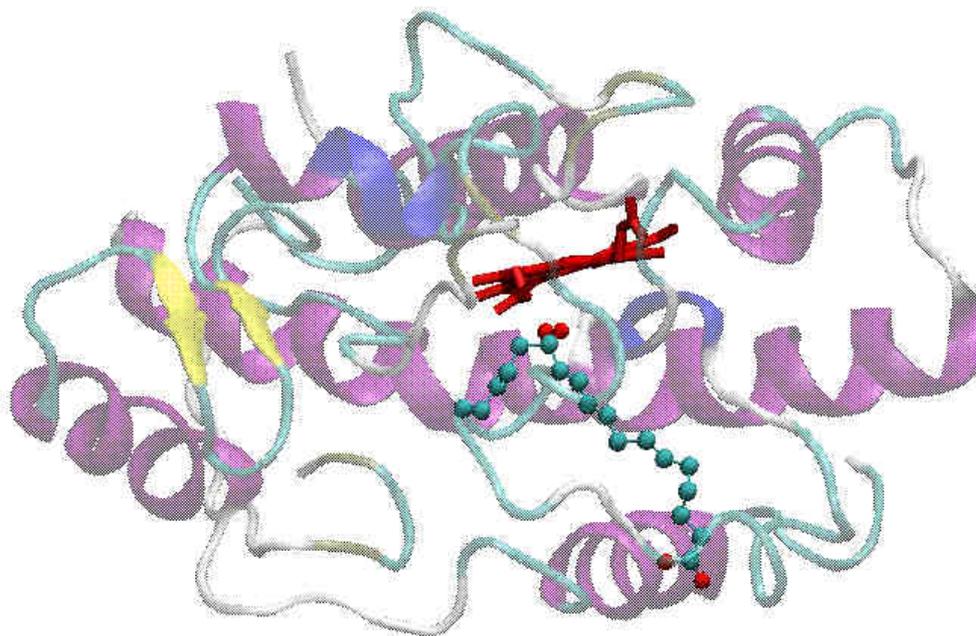


Рис. 21. Одна из структур комплекса мини-фермент с субстратом, полученная методом докинг.

Если представить лиганд в виде шарика, расположенного в центре масс лиганда, то все полученные решения можно визуализировать на одном рисунке. На Рис. 22 показаны мини-фермент-субстратные комплексы, полученные для решетки L. Также показаны аминокислотные остатки белка, которые находятся на расстоянии меньше 4 \AA от субстрата.

Для того чтобы охарактеризовать устойчивость полученных решений, то есть насколько полученные решения близки друг к другу, был выполнен анализ образования кластеров. Если среднеквадратичное отклонение (RMSD) одной полученной структуры от другой структуры не превышает 2 \AA , то считается, что эти два комплекса принадлежат одному кластеру. Чем больше комплексов образуют один кластер, тем более устойчивым является найденное решение, тем больше вероятность образования данного типа комплекса. На Рис. 22 представлен результат кластерного анализа для первого типа моделирования (Варианта L).

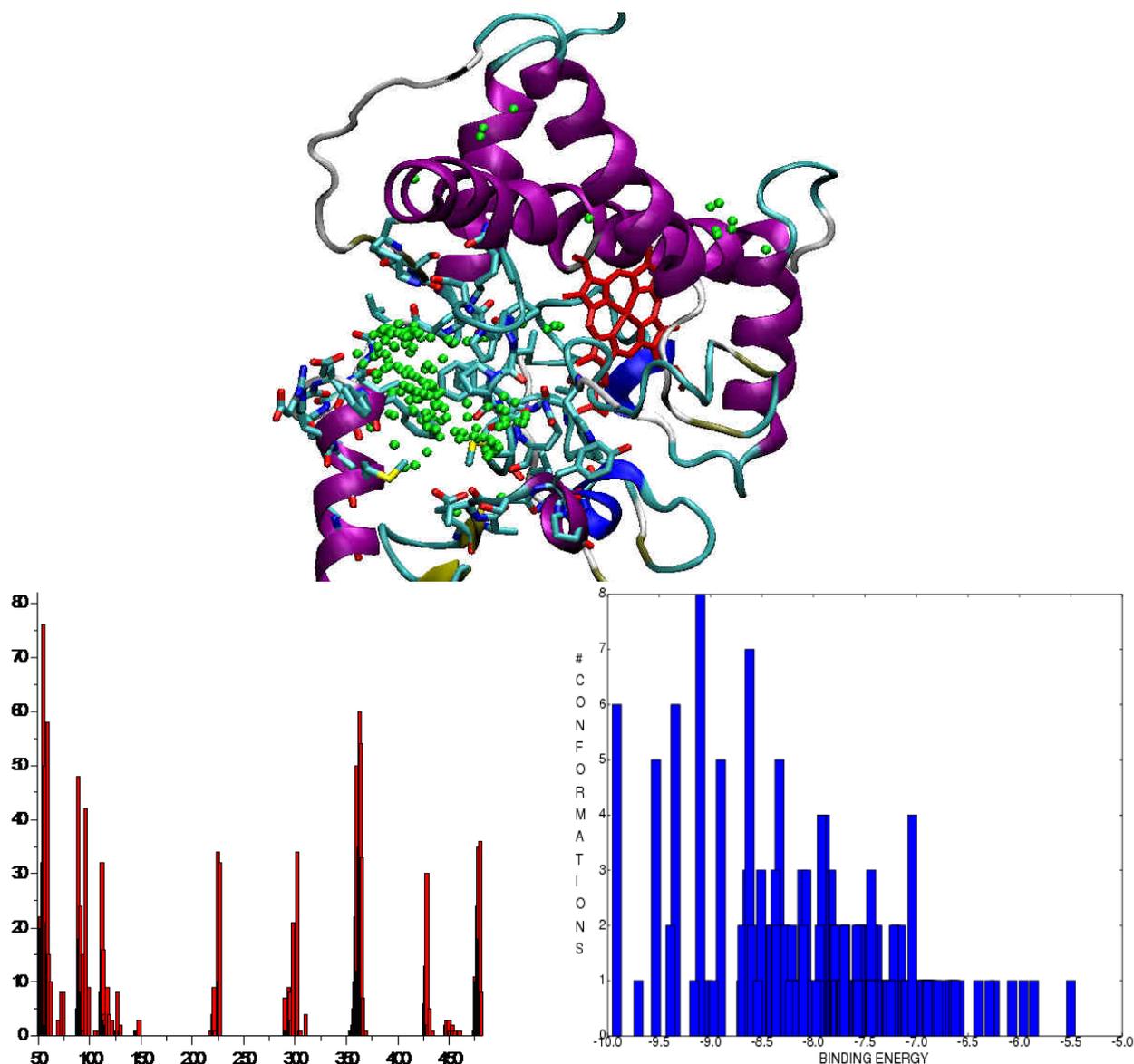


Рис. 22. Пространственное расположение субстрата в комплексах с мини-ферментом. Каждый шарик представляет собой центр масс одного лиганда. Гем показан красным цветом. Красная диаграмма – вероятность участия аминокислотных остатков мини-фермента в образовании комплекса с субстратом. Синяя диаграмма – количество конформаций в каждом кластере в зависимости от энергии кластера.

Показано количество комплексов в каждом кластере в зависимости от энергии этого кластера; с наибольшей вероятностью образуются комплексы с энергией взаимодействия -8.5 — -9 ккал/моль.

Из 256 полученных комплексов, только в восьми комплексах субстрат находится на расстоянии меньше 4 \AA от гема. Вероятность участия аминокислотных остатков мини-фермента в образовании комплекса также показана на Рис. 22. Наибольшее количество контактов с субстратом образуют аминокислотные остатки 55, 59, 89, 96, 360, 363, 364.

Уменьшение шага решетки, с одной стороны, улучшает точность описания потенциалов взаимодействия, но, с другой стороны, ограничивает область поиска наиболее выгодных конфигураций комплекса областью активного центра. Пространственное расположение лиганда и аминокислотные остатки мини-фермента, наиболее активно участвующие в образовании комплекса, при использовании решетки М показаны на Рис. 23. В этом случае 111, 117, 127, 221, 295, 298, 362 остатки белка наиболее активно участвуют в образовании комплекса; они показаны на Рис. 23 голубым цветом; аминокислотные остатки активного центра показаны желтым цветом.

В 54 комплексах из 256 комплексах субстрат находится на расстоянии меньше 4 \AA от гема. Ограничение области поиска решений областью активного центра приводит к резкому увеличению комплексов в кластере. Рис. 23 демонстрирует, что наиболее энергетически выгодные (-11.8 ккал/моль) комплексы образуются с наибольшей вероятностью.

При уменьшении шага решетки до 0.3 \AA аминокислотные остатки 111, 112, 117, 127, 129, 221, 290, 294, 295, 298, 362 наиболее активно участвуют в образовании комплекса, они показаны на Рис. 24 голубым цветом, аминокислотные остатки активного центра показаны желтым цветом. Во всех полученных комплексах субстрат находится близко от активного центра. Все полученные комплексы характеризуются высокой вероятностью образования (Рис. 24).

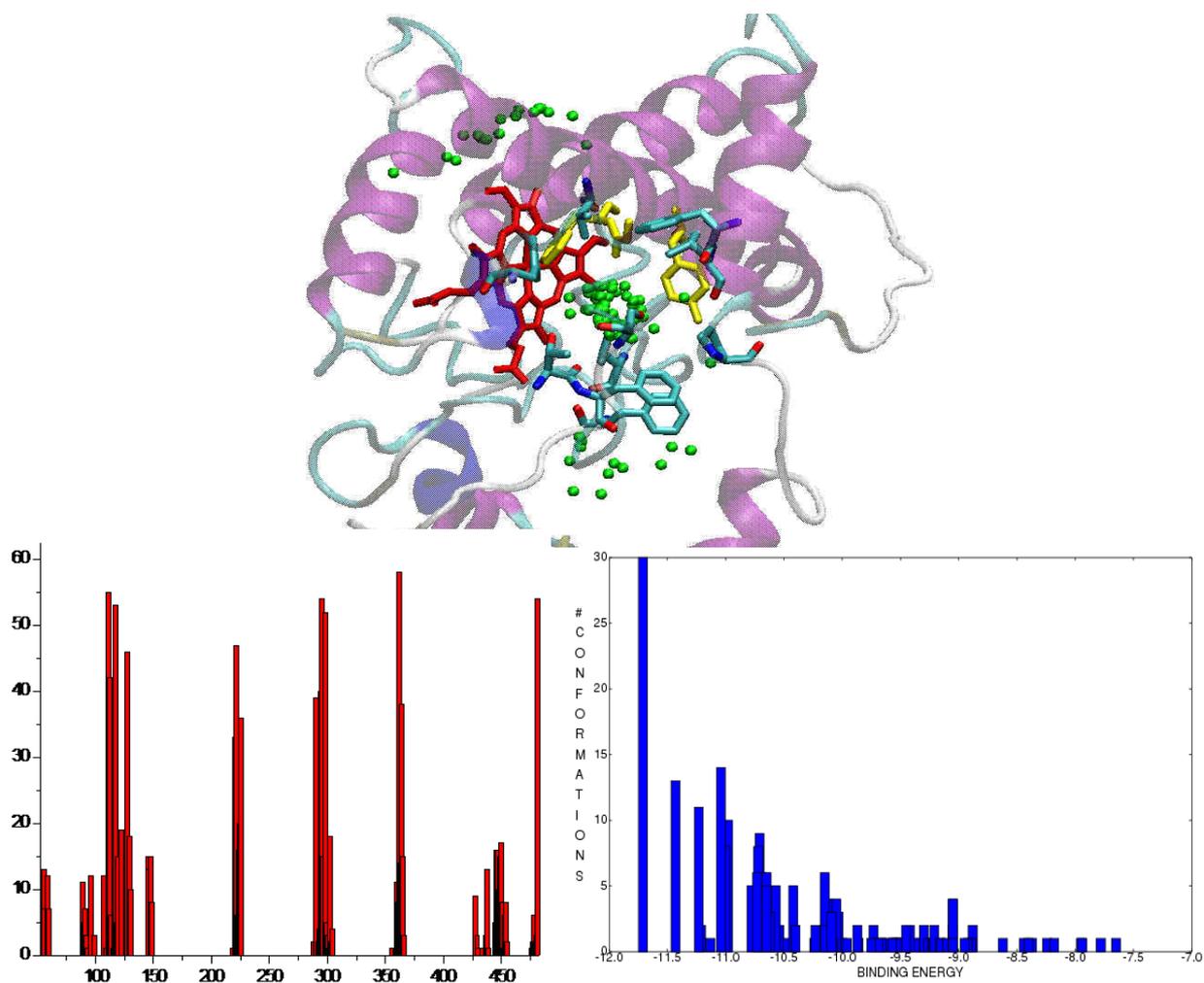


Рис. 23. Пространственное расположение субстрата в комплексах с мини-ферментом. Каждый шарик представляет собой центр масс одного лиганда. Гем показан красным цветом. Красная диаграмма – вероятность участия аминокислотных остатков мини-фермента в образовании комплекса с субстратом. Синяя диаграмма – количество конформаций в каждом кластере в зависимости от энергии кластера.

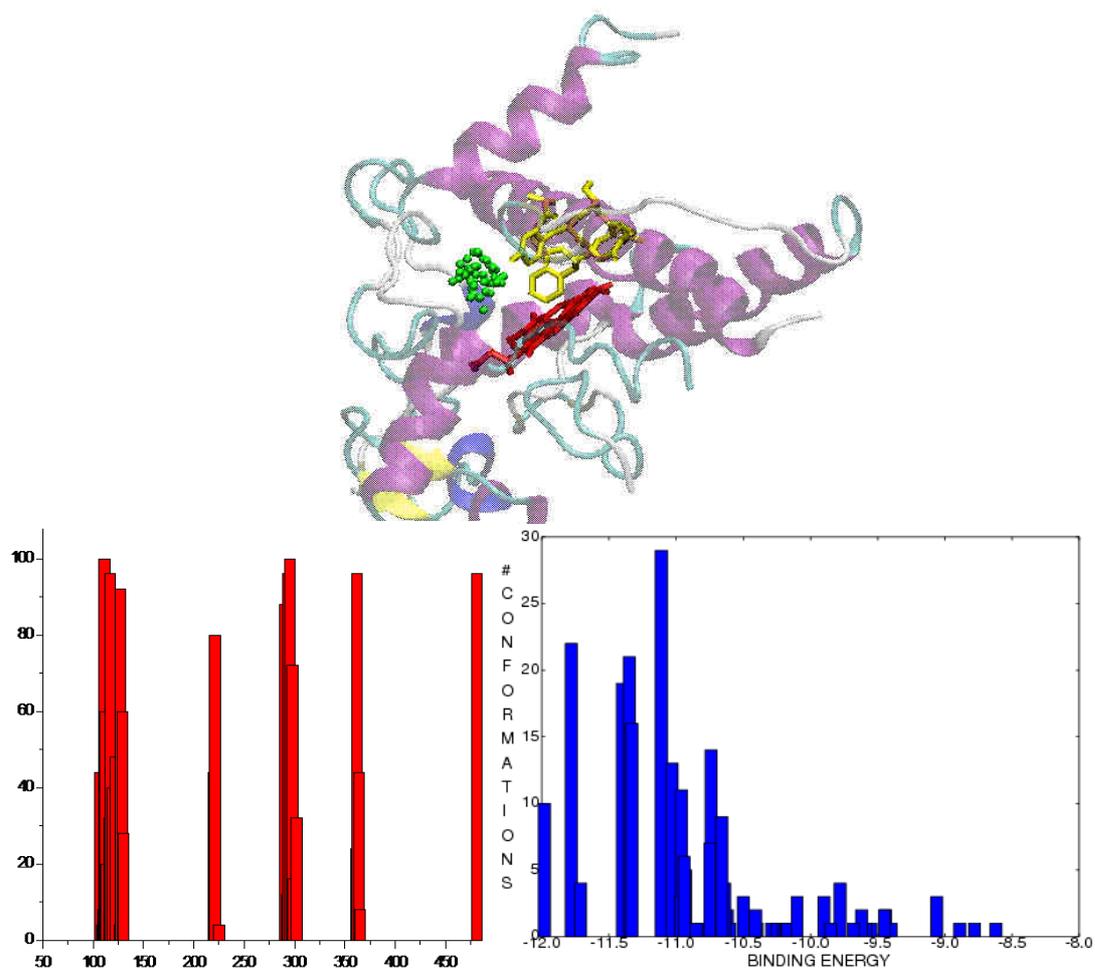


Рис. 24. Пространственное расположение субстрата в комплексах с мини-ферментом. Каждый шарик представляет собой центр масс одного лиганда. Гем показан красным цветом. Красная диаграмма – вероятность участия аминокислотных остатков минифермента в образовании комплекса с субстратом. Синяя диаграмма – количество конформаций в каждом кластере в зависимости от энергии кластера.

Анализ различных вкладов в полную энергию взаимодействия показывает, что электростатическое взаимодействие белка с субстратом слабое, и наибольший вклад в энергию взаимодействия вносят энергия Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий, водородных связей и энергия сольватации. В Таблице 2 представлены полная средняя энергия, максимальная энергия взаимодействия и константа диссоциации комплекса для всех проведенных расчетов.

Таблица 2. Средняя энергия, максимальная энергия взаимодействия, константа диссоциации комплексов, образованных мини-ферментом и субстратом.

N	Тип решетки	Средняя энергия взаимодействия (ккал/моль)	Максимальная энергия взаимодействия (ккал/моль)	Константа диссоциации (nM)
1	L	-7.5	-9.91	54.35
2	M	-9.5	-11.71	2.61
3	S	-9.93	-11.98	1.65

Сравнительный анализ полученных результатов позволяет сделать вывод, что (9*S*)-гидроперекись α -линоленовой кислоты может образовывать энергетически выгодные комплексы с мини-ферментом, с энергией взаимодействия от -3 до -12 ккал/моль. При этом субстрат локализуется как в области активного центра, так и вне его, а наиболее энергетически выгодные комплексы были обнаружены в активном центре фермента.

2.2. Подготовка предложений по биоинженерии мини-ферментов

Развитие генной инженерии и молекулярной биологии сделали процесс создания искусственных генов и конструирование экспрессионных платформ рутинной процедурой. Актуальной повесткой дня является решение проблем белковой инженерии. Центральная проблема заключается в расчете полипептидной цепи с заданной функцией соответствующего белка. В настоящее время она, конечно, не может быть решена в полном объеме. Более того, не всегда оказывается возможным предсказать каталитические свойства ферментов по их первичной структуре. В то же время, накапливающиеся данные рентгеноструктурного анализа, расширение баз данных протеомных исследований и совершенствование математического аппарата позволяют строить пространственные модели белков в комплексе с кофакторами и низкомолекулярными лигандами. В некоторых случаях удается конструировать активные центры ферментов из готовых функциональных блоков. Настоящая работа является тому подтверждением. Нам удалось по предсказанной модели путем объединения участков полипептидной цепи воссоздать функциональный цитохром P450 (CYP74), включив в его структуру гемовый кофактор. При этом искусственный цитохром не только приобрел сродство к специфичному субстрату, но и был способен к проведению катализа. Следующим шагом будет оптимизация структуры для повышения ферментативной активности, что позволит выйти на практическое применение искусственных ферментов.

В целом, конструирование мини-ферментов является мощным инструментом для понимания принципов конструирования активных центров новых ферментов, адаптированных для неклеточного катализа, востребованного в биотехнологическом производстве. Как правило, водная среда, лишенная мембранной компартментализации не соответствует оптимальному функционированию нативных белков. В этом случае, необходимо проводить модификации полипептидной цепи, заменяя мембраносвязывающие домены гидрофильными. Кроме того, следует

компенсировать пространственное разобщение ферментов, принимающих участие в биохимических каскадах. Одним из способов этого может быть объединение в одну молекулу двух и более активных центров, принимающих участие в последовательных превращениях субстрата. Подобные ферменты обладают гораздо большими скоростями реакций, что показано, в том числе, на примере гибридных белков, объединяющих липоксигеназы и цитохромы CYP74, существующие у кораллов, хордовых и некоторых бактерий.

В заключение можно сказать, что ожидаемые перспективы белковой инженерии предопределены неуклонным развитием вычислительной техники, совершенствованием алгоритмов построения моделей, развитием инструментально-технической базы исследований в области биофизики и молекулярной биологии.

3. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для реализации Проекта был проведен анализ литературных данных, соответствующих тематике настоящего Проекта. В ходе анализа литературы было выявлено, что тематика проекта является уникальной, так как не имеет аналогов в отечественной и мировой литературе. Соответственно, актуальность проекта является очевидной. Выбор дальнейшего направления исследований для реализации Проекта основан на применении новейших методов исследований, позволяющих реализовать его на высоком научном уровне. При этом большое внимание уделяется выбору объектов исследования, так как от выбора модельного объекта зависит дальнейший успех в реализации Проекта. Использование технологии рекомбинантных ДНК и различных систем экспрессии дает возможность получения препаративных количеств рекомбинантных белков, что является базой для дальнейших биоинженерных исследований. Дополнительные возможности для понимания биохимических свойств ферментов дает исследование их пространственной структуры. Использование компьютерного моделирования, технологии рекомбинантных ДНК и различных систем экспрессии дало возможность получения препаративных количеств рекомбинантных мини-ферментов, что является базой для дальнейших биофизических и биохимических исследований.

Все примененные методы позволили выполнить все работы по Проекту на высоком техническом уровне. Кроме того, была достигнута цель по содействию развитию научно-образовательной и приборной базы для подготовки студентов, аспирантов и молодых ученых в области биоинженерии, физико-химической, молекулярной и клеточной биологии, и повышению квалификации специалистов биохимического и молекулярно-биологического профиля. В рамках Проекта были закуплены оборудование, расходные материалы и химические реактивы, проведена предварительная защита кандидатской диссертации и защищена курсовая работа.

4. СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Тарчевский, И.А. Метаболизм растений при стрессе (избранные труды) / И.А. Тарчевский. – К.: ФЭН, 2001. – 448 с.
2. Itoh, A. Identification of a jasmonate-regulated allene oxide synthase that metabolizes 9-hydroperoxides of linoleic and linolenic acids / A. Itoh, A.L. Schillmiller, B.C. McCaig, G.A. Howe // *J. Biol. Chem.* – 2002. – V. 277. – P. 46051-46058.
3. Stumpe, M. Formation of oxylipins by CYP74 enzymes / M. Stumpe, I. Feussner // *Phytochemistry Review.* – 2006. – V. 5. – P. 347-357.
4. Grechkin, A.N. Recent developments in biochemistry of the plant lipoxygenase pathway / *Prog. Lipid Res.* – 1998. – V. 37. – P. 317-352.
5. Morant, M. Plant cytochromes P450: tools for pharmacology, plant protection and phytoremediation / M. Morant, S. Bak, B.L. Moller, D. Werck-Reichhart // *Curr. Opin. Biotechnol.* – 2003. – V. 14. – P. 1511-1562.
6. Minor, W. Crystal structure of soybean lipoxygenase L-1 at 1.4 Å resolution / W. Minor, J. Steczko, B. Stec, Z. Otwinowski, J.T. Bolin, R. Walter, B. Axelrod // *Biochemistry.* – 1996. V. 35. P. 10687–10701.
7. Gillmor, S.A. The structure of mammalian 15-lipoxygenase reveals similarity to the lipases and the determinants of substrate specificity / S.A. Gillmor, A. Villasenor, R. Fletterick, E. Sigal, M.F. Browner // *Nat. Struct. Biol.* – 1997. – V. 4. P. 1003–1009.
8. Coffa, G. On the relationships of substrate orientation, hydrogen abstraction, and product stereochemistry in single and double dioxygenations by soybean lipoxygenase-1 and its Ala542Gly mutant / G. Coffa, A.N. Imber, B.C. Maguire, G. Laxmikanthan, C. Schneider, B.J. Gaffney, A.R. Brash // *J. Biol. Chem.* - 2005. - V. 280. P. 38756–38766.
9. Tomchick, D.R. Structural and functional characterization of second-coordination sphere mutants of soybean lipoxygenase-1 / D.R. Tomchick, P.

- Phan, M. Cymborowski, W. Minor, T.R. Holman // *Biochemistry*. – 2001. – V. 40. P. 7509-7517.
10. Boyington, J.C. The three-dimensional structure of an arachidonic acid 15-lipoxygenase / J.C. Boyington, B.J. Gaffney, L.M. Amzel // *Science*. – 1993. – V. 260. P. 1482–1486.
11. Poulos, T.L. The 2.6-Å crystal structure of *Pseudomonas putida* cytochrome P-450 / T.L. Poulos, B.C. Finzel, I.C. Gunsalus, G.C. Wagner, J. Kraut // *J. Biol. Chem.* – 1985. – V. 260. – P. 16122-16130.
12. Poulos, T.L. High-resolution crystal structure of cytochrome P450cam / T.L. Poulos, B.C. Finzel, A.J. Howard // *J. Mol. Biol.* – 1987. – V. 195. – P. 687-700.
13. Podust, L.M. Crystal structure of cytochrome P450 14 α -sterol demethylase (CYP51) from *Mycobacterium tuberculosis* in complex with azole inhibitors / L.M. Podust, T.L. Poulos, M.R. Waterman // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2001. – V. 98. – P. 3068-3073.
14. Yano, J.K. Crystal Structure of a Thermophilic Cytochrome P450 from the Archaeon *Sulfolobus solfataricus*. / J.K. Yano, L.S. Koo, D.J. Schuller, H. Li, P.R. Ortiz de Montellano, T.L. Poulos. // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2000. – V. 275. – N. 40. – P. 31086-31092.
15. Wester, M.R. Structure of mammalian cytochrome P450 2C5 complexed with diclofenac at 2.1 Å resolution: evidence for an induced fit model of substrate binding / M.R. Wester, E.F. Johnson, C. Marques-Soares, S. Dijols, P.M. Dansette *et al.* // *Biochemistry*. – 2003. – V. 42. – P. 9335-9345.
16. Rowland, P. Crystal structure of human cytochrome P450 2D6 / P. Rowland, F.E. Blaney, M.G. Smyth, J.J. Jones, V.R. Leydon *et al.* // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2006. – V. 281. – P. 7614-7622.
17. Lee, D.-S. Structural insights into the evolutionary paths of oxylipin biosynthesis enzymes / D.-S. Lee, P. Nioche, M. Hamberg, C.S. Raman // *Nature*. – 2008. – V. 455. – P. 363-370.

- 18.Chang, Z. Crystallization and preliminary X-ray analysis of allene oxide synthase, cytochrome P450 CYP74A2, from *Parthenium argentatum* / Z. Chang, L. Li, Z. Pan, X. Wang // Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun. – 2008. – V. 64(Pt 7). – P. 668-670.
- 19.Werck-Reichhart, D. Cytochromes P450: a success story / D. Werck-Reichhart, R. Feyereisen // Genome Biol. – 2000. – V. 1. – P. 1-7.
- 20.Feyereisen, R. Insect CYP Genes and P450 Enzymes / Elsevier B.V. All rights reserved. – 2012. – P. 236-316.
- 21.Sirim, D. Prediction and analysis of the modular structure of cytochrome P450 monooxygenases / D. Sirim, M. Widmann, F. Wagner, J. Pleiss // BMC Structural Biology. – 2010. – V. 10. – P. 1-12.
- 22.Werck-Reichhart, D. Cytochromes P450 / D. Werck-Reichhart, S. Bak, S. Paquette // The Arabidopsis Book / C.R. Somerville, E.M. Meyerowitz. – Rockville, MD: American Society of Plant Biologists, 2002. – P. 1-28.
- 23.Denisov, I.G. Structure and chemistry of cytochrome P450 / I.G. Denisov, T.M. Makris, S.G. Sligar, I. Schlichting // Chem. Rev. – 2005. – V. 105. – P. 2253-2277.
- 24.Gotoh, O. Substrate recognition sites in cytochrome P450 Family 2 (CYP2) proteins inferred from comparative analyses of amino acid and coding nucleotide sequences / The Journal of biological chemistry. – 1992. – V. 267. – P. 83-90.
- 25.Bateman, A. The PLAT domain: a new piece in the PKD1 puzzle / Bateman A., Sandford R. // Curr Biol. – 1999. – V. 9. P. 588-590.
- 26.Lambert, C. ESyPred3D: Prediction of proteins 3D structures / C. Lambert, N. Leonard, X. De Bolle, E. Depiereux // Bioinformatics. – 2002. – V. 18(9). – P. 1250-1256.
- 27.Skrzypczak-Jankun, E. Three-dimensional structure of a purple lipooxygenase / E. Skrzypczak-Jankun, R.A. Bross, R.T. Carroll, W.R. Dunham, M.O. Funk // J. Am. Chem. Soc. – 2001. – V. 123. – P. 10814-10820.

28. Zheng, Y. A 49-kDa mini-lipoxygenase from *Anabaena* sp. PCC 7120 retains catalytically complete functionality / Y. Zheng, W.E. Boeglin, C. Schneider, A.R. Brash // *J. Biol. Chem.* – 2008. – V. 283(8). – P. 5138-5147.
29. Andreou, A. A bisallylic mini-lipoxygenase from cyanobacterium *Cyanothece* sp. that has an iron as cofactor / A. Andreou, C. Göbel, M. Hamberg, I. Feussner. // *J. Biol. Chem.* – 2010. – V. 285(19). – P. 14178-14186.
30. Andreou, A.Z. Properties of a mini 9R-lipoxygenase from *Nostoc* sp. PCC 7120 and its mutant forms / A.Z. Andreou, M. Vanko, L. Bezakova, I. Feussner // *Phytochemistry.* – 2008. – V. 69(9). – P. 1832-1837.
31. Di Venere, A. Structure-to-function relationship of mini-lipoxygenase, a 60-kDa fragment of soybean lipoxygenase-1 with lower stability but higher enzymatic activity / A. Di Venere, M.L. Salucci, G. van Zadelhoff, G. Veldink, G. Mei, N. Rosato, A. Finazzi-Agrò, M. Maccarrone // *J. Biol. Chem.* – 2003. – V. 278(20). – P. 18281-18288.
32. Маниатис, Т. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Д. Сэмбрук. – М.: Мир, 1984. – 480 с.
33. Berndt, K. D. Replacement of an Internal Hydration Water Molecule in BPTI: Structural and Functional Implications of a Glycine-to-Serine Mutation / K. D. Berndt, J. Beunink, W. Schrijder, K. Wüthrich // *Designed // Biochemistry.* – 1993. – V. 32. – P. 4564-4570.
34. Otting, G. Disulfide Bond Isomerization in BPTI and BPTI(G36S): An NMR Study of Correlated Mobility in Proteins / G. Otting, E. Liepinsh, K. Wiithrich // *Biochemistry.* – 1993. – V. 32. – P. 3571-3582.
35. Hwang, T.-L. Water Suppression That Works. Excitation Sculpting Using Arbitrary Wave-Forms and Pulsed-Field Gradients / T.-L. Hwang, A.J. Shaka // *J. Magn. Reson.* – 1995. – Series A 112. – P. 275-279.
36. Weigelt, J. Removal of zero-quantum coherence in protein NMR spectra using SESAM decoupling and suppression of decoupling sidebands / J.

- Weigelt, A. Hammarstrom, W. Bermel, G. Otting // *J. Magn. Res.* – 1996. – V. 110. – P. 219-224.
37. Derome, A. Rapid pulsing artifacts in double-quantum filtered COSY / A. Derome, M. Williamson // *J. Magn. Reson.* – 1990. – V. 88. – P. 177-185.
38. Piotto, M. Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions / M. Piotto, V. Saudek, V. Sklenar // *J. Biomol. NMR* – 1992. – V. 2. – P. 661-666.
39. Weiner, S.J., Kollman, P.A., Case, D.A., Singh, U.C., Ghio, C., Alagona, G., Profeta Jr., S., Weiner, P. A new force field for molecular mechanical simulation of nucleic acids and proteins *J. Am. Chem. Soc.* 106:765–784, 1984. HyperChem8, Hypercube, Inc.
40. Dewar M. J. S., Dieter K. M. Evaluation of AM1 calculated proton affinities and deprotonation enthalpies *J. Am. Chem. Soc.*, 1986, 108 (25), pp 8075–8086.
41. Morris G.M., Huey R, Lindstrom W., Sanner M.F., Belew R.K., Goodsell D.S., Olson A.J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility, *J. Comput. Chem.* (2009) 30, 2785–2791.
42. Morris, G. M., Goodsell, D. S., Halliday, R.S., Huey, R., Hart, W. E., Belew, R. K. and Olson, A. J. (1998), *J. Computational Chemistry*, 19: 1639-1662. "Automated Docking Using a Lamarckian Genetic Algorithm and Empirical Binding Free Energy Function".