

УДК 577.152.34
© Коллектив авторов

ИЗУЧЕНИЕ S1'-КАРМАНА ПЕРВИЧНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ КАРБОКСИПЕПТИДАЗЫ Т *THERMOACTINOMYCES VULGARIS* МЕТОДОМ НАПРАВЛЕННОГО МУТАГЕНЕЗА

Л.А.Трачук, А.М.Бушуева, А.Б.Шевелев, С.А.Новгородова, В.Х.Акпаров,
Г.Г.Честухина.

Институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов (ГосНИИгенетика),
113545 Москва, 1-й Дорожный проезд, 1;
тел.:315-37-38, факс:315-05-01, эл.почта:Lab_11@genetika.ru

Изучали вклад нетипичного для металлокарбоксипептидаз расположения остатка аспарагиновой кислоты в субстрат-связывающем центре карбоксипептидазы Т *Thermoactinomyces vulgaris* (СрТ) в реализацию ее двойной (А+В) субстратной специфичности. С помощью сайт-направленного мутагенеза остатков, образующих S1'-субсайт СрТ, были получены два мутанта, один из которых содержал две замены - D253S, T255D, а второй - одну T255D. Предшественники дикой формы СрТ и ее мутантных производных были экспрессированы в клетках *E. coli* в виде тел включения, ренатурированы, активированы субтилизином и очищены гель-фильтрацией на Superdex 75. Активность полученных белков проанализирована с использованием пептидных субстратов DNPAAR и ZAAL. Расчет значений K_m и K_{cat} показал, что введение остатка аспарагиновой кислоты в 255 положение (аналогично карбоксипептидазе В животных) не привело к существенному изменению каталитической активности у мутанта D253S, T255D по отношению к обоим субстратам. Наличие дополнительного остатка аспарагиновой кислоты в S1'-субсайте одиночного мутанта не влияло на связывание ферментом субстрата DNP-AAR-OH. В то же время, в случае T255D мутанта значение K_m гидролиза гидрофобного субстрата ZAAL увеличилось по сравнению с диким типом СрТ примерно в 40 раз и достигло уровня, сравнимого с карбоксипептидазой В.

Полученные экспериментальные данные позволили предположить, что низкая активность СрТ по отношению к положительно заряженным аминокислотным остаткам субстрата не определяется только месторасположением остатка Asp в S1' - субсайте кармана первичной специфичности фермента.

Ключевые слова: карбоксипептидаза Т, карбоксипептидазы А и В, специфичность, сайт-направленный мутагенез, *Thermoactinomyces vulgaris*.

ВВЕДЕНИЕ. Карбоксипептидаза Т (СрТ) - внеклеточная металло-экзопептидаза *Thermoactinomyces vulgaris* - содержит в составе зрелого фермента (состоящего из 326 аминокислотных остатков) один ион цинка и синтезируется в виде неактивного предшественника (424 остатка), включающего пропептид (около 70 остатков) [1].

Многостороннее изучение СрТ (в том числе определение аминокислотной последовательности [2] и установление третичной структуры [3]) показывает, что, несмотря на умеренное сходство первичной структуры (27-30%), пространственная организация зрелого фермента очень похожа на таковую карбоксипептидаз А (СрА) и В (СрВ) млекопитающих [3].

ИЗУЧЕНИЕ S1'-КАРМАНА КАРБОКСИПЕПТИДАЗЫ T *THERMOACTINOMYCES VULGARIS*

За первичную специфичность всех Zn-металлокарбоксипептидаз предположительно ответственны аминокислотные остатки 203, 207, 243, 250, 253, 255 и 268 [4, 5], боковые радикалы которых формируют S1'-карман. (Здесь и далее нумерация остатков дана по CrA). Специфическое отщепление ароматических и объемных алифатических остатков под действием CrA традиционно связывают с наличием Ile243 и Leu255 в S1'-кармане [4]. В то же время, взаимодействие CrB с положительно заряженными остатками в P1'-положении субстрата обусловлено Asp255 [6].

Подобно карбоксипептидазе SG *Streptomyces griseus* [7] и карбоксипептидазе S *Saccharomyces cerevisiae* [8], CrT проявляет двойную субстратную специфичность, отщепляя с С-конца субстрата и гидрофобные, и основные аминокислоты, совмещая, таким образом, свойства CrA и CrB.

Сравнительный анализ вариабельных аминокислотных остатков в S1'-субсайте CrT позволил Теплякову и соавт. [3] предположить, что способность фермента гидролизовать положительно заряженные остатки субстрата также, как и в случае CrB, определяется присутствием остатка аспарагиновой кислоты, который, однако, занимает иную позицию (Asp253). В то же время, предпочтительное отщепление с С-конца субстрата алифатических остатков, по мнению этих авторов, можно объяснить уменьшением размера субстрат-связывающего кармана, обусловленного особенностями структуры боковых цепей остатков 243, 250, 253 и 255 [2]. CrT отщепляет аргинин и лизин с карбоксильного конца субстрата соответственно в 10 и 100 раз хуже, чем CrB, причем предпочтение к отщеплению гидрофобных остатков у CrT значительно выше, чем к основным [9].

Мы предположили, что значительное (по сравнению с CrB) уменьшение активности CrT в отношении субстратов, содержащих С-концевой лизин или аргинин, связано с отличным (по сравнению с CrB) расположением остатка аспарагиновой кислоты в субстрат связывающем кармане (в 253, а не в 255 позиции). Для проверки этой гипотезы проведен направленный мутагенез 253 и 255 остатков CrT и изучены энзиматические свойства полученных мутантов.

МЕТОДИКА. Материалы. Рестриктазы, стандартные праймеры pUC/M13 были получены от фирмы "Fermentas" (Литва), ДНК-полимераза Taq - от фирмы "Бιονэм" (Москва, Россия), вектор pET23a - от "Novagene" (США). Штамм *E. coli* BL21(DE3)pLysS, содержащий ген полимеразы фага T7, и штамм BMH 71-18 (*mutS::Tn10*, [*F'* lacZDM15]) были получены от фирмы "Promega" (США). Для Вестерн-блоттинга использовались нитроцеллюлозные мембраны ("Sigma", США) и кроличьи антитела против CrT, полученные, как описано ранее [1], а также козы антикроличьи антитела против тяжелой и легкой цепей IgG, конъюгированные с щелочной фосфатазой, и субстратный кит для щелочной фосфатазы BCIP/NBT производства "BioRad" (США).

Исходный ген CrT. Ген, кодирующий проCrT, амплифицировали с помощью ПЦР, используя праймеры JNC (*SacI*, 5'-TCGAGCTCGGTTTCAGCCAGAATATC-GAAA-3') и pUC/M13-forward и плазмидную ДНК pOZ119 [1] в качестве матрицы. Последовательность полноразмерного природного гена CrT *T. vulgaris* ранее депонирована в банке генов EBI/EMBL (номер доступа X56901).

Дизайн конструкции, кодирующей профермент CrT. Исходный ген про-CrT в виде продукта ПЦР (см. выше) клонировали по сайтам *SacI* и *XhoI* в вектор pET23a. Полученную конструкцию обозначили как pET-proCrT. Соответствие последовательности вставки в составе новой конструкции подтверждали полным секвенированием с использованием набора K1711 (MBI "Fermentas") на основе термостабильной ДНК-полимеразы.

Получение мутантных вариантов гена про-CrT. Одиночную мутацию T255D (T255D - мутант) и двойную мутацию D253S/T255D (D253S, T255D - мутант) проводили с использованием стандартных праймеров T7promoter/T7terminator (MBI "Fermentas") и матричной ДНК конструкции pET-proCrT по двухстадийной схеме направленного ПЦР-мутагенеза. В качестве

мутагенизирующих праймеров при получении мутантного варианта T255D использовали пару DMD/DMD-rev:

DMD 5'-CCGATGGGGATATGGACCGACTGGGCCTATGG-3'

DMD-rev 5'-CCATAGGCCCAGTCGTCCATATCCCCATCGG'-3',

а при получении мутантного варианта CrT-SMD:

SMD 5'-GGGAGCATGGACGACTGGGCCTATGG-3')

SMD-rev 5'-CCATAGGCCCAGTCGTCCATGCTCCCATCGGGTGATGT-3').

Полученные в результате второй амплификации ПЦР-продукты, кодирующие мутантные варианты гена про-CrT, клонировали по сайтам *SacI* и *XhoI* в вектор pET23a. Полученные конструкции обозначили как pET-CrT-DMD и pET-CrT-SMD. Соответствие ожидаемой последовательности вставок в составе новых конструкций подтверждали полным секвенированием.

Получение и идентификация профермента CrT в клетках *E. coli*.

Природный и мутантные варианты гена про-CrT в составе конструкций pET-proCrT, pET-CrT-DMD и pET-CrT-SMD экспрессировали в клетках штамма *E. coli* BL21(DE3). Посевной материал выращивали при 28°C на среде LB с добавлением 100 мкг/мл ампициллина. При этом 750 мкл посевного материала вносили в колбу, содержащую 75 мл свежей среды (LB с добавлением 100 мкг/мл ампициллина). Культивирование при 28°C продолжали до достижения культурой $O.D._{660}=0,6$. После этого туда вносили водный раствор ИПТГ до конечной концентрации 2 мМ. После индукции культуру продолжали выращивать еще в течение 4-6 часов, после чего немедленно собирали клетки центрифугированием.

Очистка тел включения. После индукции IPTG 750 мл культуральной жидкости центрифугировали при 5000 об/мин при 15°C. После осаждения клетки лизировали в течение 2 ч при 30°C в 40 мл буфера А (50 мМ трис-HCl, pH 8,0, 50 мМ ЭДТА, 5% (по объему) тритон X-100, 8% (вес/объем) сахара, содержащем 0,2 мг/мл лизоцима. Затем клетки разрушали ультразвуком и растворимую фракцию отделяли центрифугированием при 5000 об/мин в течение 40 мин при 4°C. Осадок ресуспендировали в 40 мл буфера В (50 мМ трис-HCl, pH 8,0, 0,5 М NaCl). Суспензию центрифугировали при 10000 об/мин в течение 20 мин при 4°C. Подобную процедуру ресуспендирования-центрифугирования повторяли трижды. Затем осадок ресуспендировали в 40 мл дистиллированной воды, центрифугировали при тех же условиях и нерастворимый материал хранили при -20°C.

Ренатурация проCrT и ее мутантных форм. Тела включения растворяли при 4°C в 6 М гуанидин гидрохлориде до конечной концентрации белка 1-1,2 мг/мл. Нерастворимый осадок отделяли центрифугированием при 10000 об/мин при 4°C в течение 30 мин. Денатурированный растворенный белок быстро разводили в 100 раз, добавляя буфер, содержащий 50 мМ трис-HCl (pH 7,5), 500 мМ NaCl и 30% глицерин. Реакционную смесь инкубировали в течение ночи при 25°C и затем быстро разводили двумя объемами 50 мМ трис-HCl (pH 7,5), 500 мМ NaCl. Раствор концентрировали путем ультрафильтрации через мембрану YM10 ("Amicon") и центрифугировали при 10000 об/мин при 4°C в течение 20 мин.

Активация проCrT. После ренатурации к образцам проCrT добавляли субтилизин в молярном соотношении 100:1 и инкубировали при 30°C в течение 2 ч. Для стабилизации CrT добавляли $CaCl_2$ до конечной концентрации 1 мМ.

Очистка зрелой формы CrT. Активированную субтилизином CrT и ее мутантные формы хроматографировали в системе FPLC на колонке Superdex 75, уравновешенной 50 мМ трис-HCl (pH 8,0), 500 мМ NaCl, 1 мМ $CaCl_2$, 10% (по объему) глицерин (буфер С). Фракции, элюируемые с колонки, были объединены и проанализированы с помощью ДС-Na-электрофореза.

Изучение энзиматических свойств CrT и ее мутантных форм. Ферментативную активность CrT и ее мутантных форм изучали по способности отщеплять остаток аргинина от DNPAARH или лейцина от ZAAL [9].

В случае гидролиза DNPAARH реакционная смесь содержала 0,4 мл 50 мМ трис-HCl, pH 7,5, 0,5-5 мМ субстрата и 40 мкл раствора CrT (0,01 мг/мл).

ИЗУЧЕНИЕ S1'-КАРМАНА КАРБОКСИПЕПТИДАЗЫ Т *THERMOACTINOMYCES VULGARIS*

Инкубацию проводили при 37°C, реакцию останавливали добавлением 40 мкл 50% CH₃COOH.

При гидролизе ZAAL 6 мл 50 mM трис-HCl буфера, pH 7,7, содержащего 10-100 мкМ субстрата и 10 мкл раствора СрТ (0,01 мг/мл), инкубировали при 37°C в течение 2,5-10 мин. Реакцию останавливали добавлением 360 мкл 3 М HCl, полученный раствор высушивали лиофильно и затем растворяли в 0,2 М Na-цитратном буфере (pH 2,2). Образцы анализировали на аминокислотном анализаторе LC-5001 (Германия).

Кинетические характеристики дикой формы СрТ и ее мутантных производных были получены при использовании различных концентраций субстратов ZAAL и DNPAARH при постоянной концентрации фермента. Реакцию проводили в 50 mM трис-HCl, pH 7,5 при 37°C. Значения K_m и V_{max} высчитывали, используя программу Origin 3.5 ("Microcal").

Электрофоретический анализ белковых фракций, полученных при выделении СрТ и ее мутантов, осуществляли методом электрофореза в 7,5% полиакриламидном геле в присутствии ДС-Na [10]. В качестве стандартов молекулярной массы использовали БСА (65 кДа), яичный альбумин (45 кДа), дегидрогеназу фосфолипидного альдегида (36 кДа), карбоангидразу (29,5 кДа) и соевый ингибитор трипсина (20 кДа).

Определение N-концевой аминокислотной последовательности. Зрелую форму СрТ, полученную активацией проСрТ субтилизином, после электрофореза в присутствии ДС-Na с помощью электроблоттинга переносили на нитроцеллюлозную мембрану ("Immobilon") и секвенировали с помощью газофазного секвенатора (470A, Applied "Biosystem", США).

Концентрацию белка определяли согласно методу Bradford [11].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Металлокарбоксипептидазы А и В млекопитающих, резко отличающиеся по субстратной специфичности, в зоне связывания субстрата, тем не менее, имеют только две замены: Ile243Gly и Ile255Asp255. Считается, что в СрА остаток Ile в 255 положении обеспечивает контакт фермента с гидрофобным боковым радикалом субстрата, тогда как в СрВ остаток Asp255 образует солевой мостик с положительно заряженным боковым радикалом субстрата. Функциональная роль этого остатка подтверждена в работе Edge и соавт. [13], которые путем замены остатка Asp 255 на Arg или Lys получили фермент, отщепляющий остатки дикарбоновых аминокислот от гиппурил-аспарагината и гиппурил-глутамата.

СрТ, отличающаяся от СрА и СрВ пятью аминокислотными заменами в области S1'-субсайта (табл.1), лучше связывает и гидролизует гидрофобные субстраты, хотя обладает и активностью типа В [9]. Причина гидрофобной селективности СрТ не вполне ясна. На дне полости S1'-субсайта СрТ в 255 позиции (в отличие от СрА) отсутствует остаток с разветвленным алифатическим боковым радикалом, способным образовывать гидрофобный контакт с субстратом, в то время как остаток треонина 255 и соседний с ним остаток аспарагиновой кислоты 253 - гидрофильны. Однако гидрофильность Asp253 СрТ понижена по сравнению с Asp255 СрВ из-за образования водородной связи Asp253-Thr255, ухудшающей их способность связывать воду [1]. К сожалению, структура зрелой СрВ доступна лишь с невысоким разрешением [14], что не позволяет идентифицировать молекулы воды в зоне связывания субстрата. Однако поскольку в S1'-субсайте прокарбоксипептидазы В достоверно доказано отсутствие связанной с карбоксилем аспарагиновой кислоты структурной воды, речь может идти, скорее всего, о подвижной воде.

Активность СрТ в отношении положительно заряженных субстратов связывается с присутствием в S1'-субсайте остатка аспарагиновой кислоты, расположенного в 253 позиции (ближе к входу в карман связывания).

Мы предположили, что измененная (по сравнению с СрВ) топология варибельного остатка Asp может являться одной из причин сравнительно низкой

Таблица 1. Аминокислотные остатки, участвующие в формировании S1' - кармана специфичности карбоксипептидаз А, В и Т.

Фермент	Аминокислотный остаток							
	203	207	243	248	250	253	255	268
СрА	Leu	Gly	Ile	Tyr	Ala	Gly	Ile	Thr
СрВ	Leu	Ser	Gly	Tyr	Ala	Gly	Asp	Thr
СрТ	Leu	Gly	Ala	Tyr	Thr	Asp	Thr	Thr

активности СрТ при гидролизе DNPAAR (табл. 2). Чтобы выяснить, как месторасположение остатка аспарагиновой кислоты в S1' - субсайте карбоксипептидазы Т влияет на связывание субстрата, мы поместили его в позицию 255, характерную для СрВ, а в 253 позицию был введен остаток серина, структурно близкий Thr255, но лишенный, однако, его гидрофобной метильной группы (мутант D253S,T255D). Мы предположили также, что присутствие дополнительного остатка аспарагиновой кислоты в зоне S1'-субсайта повысит сродство СрТ к положительно заряженным субстратам и уменьшит связывание гидрофобных субстратов (мутант T255D).

Таблица 2. Кинетические константы карбоксипептидазы Т и ее мутантных форм в сравнении с карбоксипептидазами А и В млекопитающих.

Фермент							Специфичность*
	K_m	k_{cat}	k_{cat}/K_m	K_m	k_{cat}	k_{cat}/K_m	
D253S,T255D	$5,3 \times 10^{-3}$	5,5	$1,0 \times 10^3$	$4,9 \times 10^{-3}$	17	$3,5 \times 10^5$	350
T255D	$6,9 \times 10^{-3}$	2,1	$3,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^{-3}$	14	$1,4 \times 10^4$	47
СрТ	$2,8 \times 10^{-3}$	6,9	$2,5 \times 10^3$	$2,6 \times 10^{-5}$	12	$4,6 \times 10^5$	180
СрВ	$6,6 \times 10^{-5}$	35	$5,3 \times 10^5$	$1,0 \times 10^{-3}$	14	$1,4 \times 10^4$	0,026
СрА	-	-	-	$1,2 \times 10^{-5}$	35	$2,9 \times 10^6$	-

($[k_{cat}] = s^{-1}$; $[K_m] = M$; $[k_{cat}/K_m] = s^{-1}M^{-1}$ * Специфичность - $[k_{cat}/K_m]Leu/[k_{cat}/K_m]Arg$).

Экспрессия гена прокарбоксипептидазы Т (проСрТ) в клетках *E. coli*.

Фрагмент природного гена *cpt*, полученный, как описано в разделе "Методика", в виде фрагмента ДНК размером 1560 п.н., соответствует проферменту СрТ, содержащему пропептид, но лишенному препептида. Этот фрагмент был клонирован в экспрессионный вектор рЕТ23а, где может транскрибироваться под контролем промотора гена 10 фага Т7. Открытая рамка считывания сконструированного в результате клонирования химерного гена начинается с инициаторного кодона гена 10 и нуклеотидной последовательности, кодирующей 18 N-концевых аминокислотных остатков соответствующего фагового белка. Расположенная далее последовательность проСрТ представлена 72 остатками пропептида и 326 остатками зрелого фермента (рис.1). На основании такой структуры можно предполагать, что химерная проСрТ должна быть лишена способности к секреции в периплазму *E. coli*.

Как показал анализ клеточных лизатов рекомбинантных штаммов, химерная проСрТ после индукции IPTG накапливалась преимущественно в виде нерастворимых тел включения в клетках штамма BL21(DE3). Согласно данным ДС-На-электрофореза и Вестерн-блоттинга уровень продукции проСрТ достигал 25% от общего клеточного белка (рис.2, дорожка 2). Кажущаяся молекулярная масса проСрТ, как и ожидалось, составила около 46 кДа.

Получение зрелой формы СрТ. Полученные из *E. coli* тела включения были частично очищены, как описано в разделе "Методика". Согласно данным ДС-На-электрофореза, чистота препарата проСрТ на этой стадии очистки достигала примерно 80% (рис.2, дорожка 3). Выход препарата проСрТ и ее мутантных форм на этой стадии очистки составлял примерно 200 мг с одного литра культуры.

ИЗУЧЕНИЕ 5'-КАРМАНА КАРБОКСИПЕПТИДАЗЫ Т *THERMOACTINOMYCES VULGARIS*

SD 90 100 110 120* 130 140 150 SacI 160
 TTTAAGAAGGAGATATACATATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTCGCGGATCCGAATTCGAGCTCGGTTTC
 M A S M T G G Q Q M G R G S E F E L G F
 предполагаемый сайт процессинга препептида
 √ 170 180 190 200 210 220 230 240
 AGCCAGAATATCGAAAACCCCTTCCATTTTCGATTTGGGCATCAAGCTCTATAAAATCGACGGCGTCAGCACCAAGAACA
 S Q N I E N P S I F D L G I K L Y K I D G V S T K E Q
 250 260 270 280 290 300 310 320
 GCGTTTCAGCGATCGCCTCAACTGGTGCGGCGATTGAAGAAGTGGGCAAAGATTACGTCAAAGTGCTGGCCACACCTTCCG
 R S A I A S T G A A I E E V G K D Y V K V L A T P S
 процессинг препептида
 330 340 350 360 370 380 √ 390 400
 AAGCCAAAGCAGATCAAGCAAAAAGGCTTTACCGCTACTGTAGACACCTCATTTGACCACACAAGATTTTCCCTCTTACGAC
 E A K Q I K Q K G F T A T V D T S L T T Q D F P S Y D

Рисунок 1.
 Последовательность ДНК химерного гена проСрТ в составе конструкции рЕТ-проСрТ.
 Подписаны сайт клонирования SacI, последовательность Шайна-Дельгарно и старт трансляции. Значками отмечены предполагаемый природный сайт отщепления препептида (□) и препептида (□).

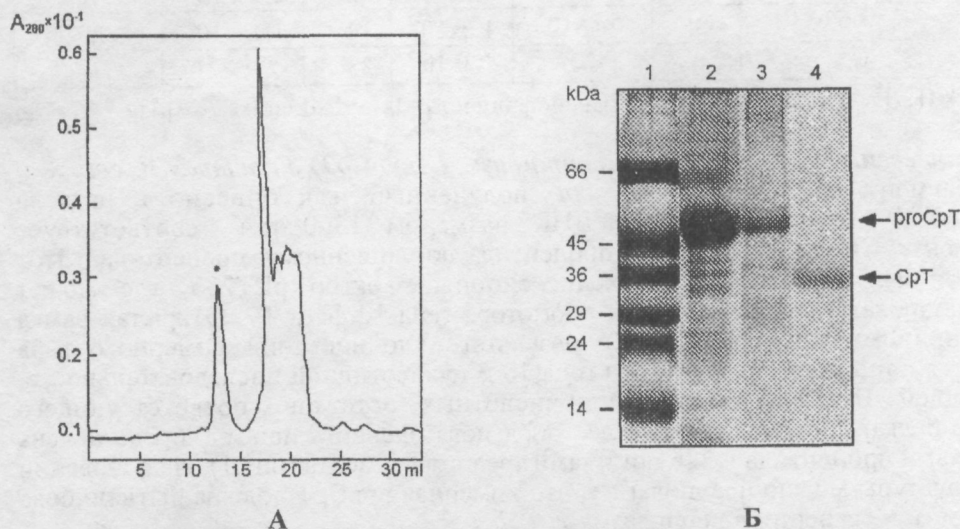


Рисунок 2.
 А. Гель-фильтрация ренатурированного и активированного предшественника СрТ на Superdex 75 (FPLC). Звездочкой (*) обозначен пик, соответствующий зрелой СрТ.
 Б. ПААГ-электрофорез (12,5%) в присутствии SDS: 1) стандарты белков; 2) проСрТ в виде тел включения; 3) проСрТ после ренатурации; 4) СрТ, полученная активацией проСрТ субтилизином.

Нативная форма проСрТ и ее мутанты были денатурированы и затем ренатурированы согласно приведенному протоколу. На основании данных ДС-На-электрофореза в растворимой (ренатурированной) форме оказывалось около 90% от общего количества денатурированной проСрТ. В присутствии глицерина

рефолдированные белки были стабильны не менее 1 месяца при 10°C. Обработка субтилизином приводила к появлению ферментативной активности, в то время как трипсин и химотрипсин не обладали подобным эффектом. Полученная таким способом зрелая СрТ была стабильна к действию различных концентраций субтилизина.

Согласно данным аминокислотного секвенирования, двенадцать N-концевых остатков СрТ, полученной при активации проСрТ субтилизином, были идентичны таковым в составе зрелой СрТ из *T. vulgaris* [12].

Активированная субтилизином СрТ и ее мутантные формы были очищены с помощью гель-фильтрации на Superdex 75. Полученные фракции содержали единственный белок с молекулярной массой около 36 кДа (рис.2, дорожка 4), способный отщеплять остаток аргинина от субстрата DNPAAR. Общий выход очищенной зрелой СрТ, а также ее мутантных форм составлял примерно 7-12% от исходного денатурированного белка.

Энзиматические свойства мутантных форм СрТ

Кинетические константы вычислены на основании определения скорости гидролиза двух пептидных субстратов DNPAAR и ZAAL (табл.2). Как видно из представленных в таблице данных, введение остатка аспарагиновой кислоты в 255 позицию не привело к существенному изменению энзиматической активности у T255D мутанта ни по одному из использованных нами субстратов. Значения K_m у D253S, T255D-мутанта как в случае гидролиза DNPAAR, так и ZAAL были примерно в два раза выше, чем у дикой формы СрТ, а k_{cat} были примерно на том же самом уровне, и поэтому значения k_{cat}/K_m были в два раза меньше. D255S, T255D- мутант отщеплял остаток лейцина примерно в 300 раз лучше, чем остаток аргинина.

Значение K_m у T255D-мутанта при гидролизе DNPAAR было в 2,5 раза выше, а k_{cat} - в 3 раза меньше и, как результат, соотношение констант k_{cat}/K_m было в 8 раз меньше, чем у дикого варианта СрТ.

При гидролизе субстрата ZAAL T255D-мутантом значение K_m повышалось примерно в 40 раз и достигало уровня, сравнимого с СрВ. Значение k_{cat}/K_m в этом случае было в 14 раз меньше, чем у дикой формы СрТ.

Соотношение активностей T255D-мутанта при гидролизе гидрофобного и положительно заряженного субстратов изменялось примерно в 3 раза (в основном за счет ухудшения гидролиза ZAAL (табл.2)).

Таким образом, улучшения связывания положительно заряженного субстрата мутантными формами СрТ не произошло. Очевидно, положение переменного остатка аспарагиновой кислоты в S1' - субсайте (мутант D253S, T255D) не определяет тип специфичности карбоксипептидазы Т. Кроме того, введение дополнительной карбоксильной группы (мутант T255D) не увеличивает отрицательный заряд зоны связывания, по-видимому, из-за сдвига значений рК пространственно сближенных карбоксильных групп (как это наблюдается в случае щавелевой кислоты или в активном центре карбоксильных протеиназ). Альтернативное объяснение состоит в том, что избыточный отрицательный заряд зоны связывания компенсируется противоионом растворителя.

Ухудшение связывания гидрофобного лейцинового субстрата мутантом T255D (табл. 2) предполагает, что замена треонина 255 на аспарагиновую кислоту в мутанте T255D открывает возможность для образования дополнительной водородной связи между карбонильными кислородами Asp255 и/или Asp253 и молекулами воды, что снижает сродство фермента к гидрофобным субстратам. Связывание гидрофобного субстрата мутантом Asp253Ser, T255D по сравнению с СрТ изменилось незначительно (табл. 2).

Значения k_{cat} в отношении как заряженных, так и гидрофобных субстратов у мутантных форм СрТ остались практически неизменными (табл. 2). Действительно, зона каталитического центра не подвергалась мутациям, и, по всей видимости, произведенные замены не сказались на её конфигурации.

ИЗУЧЕНИЕ S1'-КАРМАНА КАРБОКСИПЕПТИДАЗЫ Т *THERMOACTINOMYCES VULGARIS*

Поскольку введение остатка Asp253 СрТ в позицию, характерную для СрВ, не улучшило значение K_m , то закономерно возникает вопрос, чем же обусловлено различие в связывании положительно заряженных субстратов этими ферментами. Размер кармана первичной специфичности СрТ несколько уменьшен по сравнению с СрВ из-за замен G253D, G243A, A250T, однако отсутствие различий в K_m для объемистых аргининовых субстратов и менее объемных лизиновых субстратов у СрТ [9] делает предположение об эффекте стерического фактора маловероятным. Более правдоподобно предположение об определяющей роли остатка Arg145, который сближен с зоной связывания субстрата в случае карбоксипептидаз А и Т, но отдален от нее в случае карбоксипептидазы В [1].

Полученные результаты дают основание предполагать, что различие в селективности действия СрТ и СрВ определяется не только аминокислотными остатками, непосредственно формирующими структуру кармана первичной специфичности, но и остатками, удаленными от S1' - субсайта.

Работа была частично поддержана грантами РФФИ №99-04-48812 и №02-04-48755.

ЛИТЕРАТУРА

1. Smulevitch S.V., Osterman A.L., Galperina O.V., Matz M.V., Zagnitko O.P., Grishin N.V., Kadyrov R.M., Tsaplina I.A., Chestukhina G.G. and Stepanov, V.M. (1991) FEBS Lett., **291**, 75-78.
2. Osterman, A.L., Grishin, N.V., Smulevitch, S.V., Matz, M.V., Zagnitko, O.P., Revina, L.P., and Stepanov, V.M. (1992) J. Protein Chem., **11**, 561-570.
3. Teplyakov, A., Polyakov, K., Obmolova, G., Strokopytov, B., Kuranova, I., Osterman, A., Grishin, N., Smulevitch, S., Zagnitko, O., Galperina, O., et al. (1992) Eur. J. Biochem., **208**, 281-288.
4. Hartsuck J.A. and Lipscomb W.N. (1971) The Enzymes, **3**, 1-54.
5. Schmid M.F. and Herriott J.R. (1976) J.Mol.Biol. **103**, 175-190.
6. Folk J.E. (1971) in The enzymes (Boyer P.D., ed.), **3**, 55-79.
7. Narahashi Y. (1990) J.Biochem., **107**, 879-886.
8. Felix F. and Brouillett, N. (1966) Biochem.Biophys. Acta, **122**, 127-144.
9. Stepanov V.M. (1995) in Methods in Enzymology (Barrett A.J., ed.) **248**, 675-683.
10. Laemmli U.K. (1970) Nature, **227**, 680-685.
11. Bradford M. (1976) Anal.Biochem., **72**, 248-254.
12. Остерман А.Л., Степанов В.М., Руденская Г.Н., Ходова О.М., Цаплина И.А., Яковлева М.Б., Логинова Л.Г. (1984) Биохимия **49**, 292-301.
13. Edge, M., Forder, C., Hennam, J., Lee, I., Tonge, D., Hardern, I., Fitton, J., Eckersley, K., East, S., Shufflebotham, A., et al. (1998) Protein Engineering, **11**, 1229-1234.
14. Coll, M., Guasch, A., Aviles, F. X., Huber, R. (1991) EMBO J., **10**, 1-9.

Поступила 12.07.2002.

CHARACTERIZATION OF THE S1' SUBSITE SPECIFICITY OF CARBOXYPEPTIDASE T THERMOACTINOMYCES VULGARIS BY SITE-DIRECTED MUTAGENESIS.

L.A.Trachuk, A.M.Bushueva, A.B.Shevelev, S.A.Novgorodova, V.H.Akparov,
G.G.Chestukhina

Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, Maskow, Russia
Tel.: 315-37-38, fax:315-05-01, E-mail: Lab_11@genetika.ru

The site-directed mutagenesis in the S1'-pocket of *Thermoactinomyces vulgaris* carboxypeptidase T was performed and two variants containing double D253S,T255D and single T255D mutations were obtained. Precursors of the wild-type carboxypeptidase T and its mutant derivatives were expressed in *Escherichia coli* as inclusion bodies, refolded, activated by subtilisin, purified by gel filtration on Superdex G-75. The catalytic activity with tripeptide substrates DNPAAR and ZAAL was analysed. The introduction of the aspartic residue in 255 position (like to mammalian carboxypeptidase B), insignificantly enzymatic activity of the double mutant towards both substrates, as measured by K_m and k_{cat} . An addition of the aspartic residue into S1'-binding pocket did not affect single mutant binding with the basic substrate while the K_m value for the hydrophobic substrate increased approximately 40 times as compared with wild-type carboxypeptidase T and attained a level comparable with carboxypeptidase B.

Key words: carboxypeptidase T, specificity, site-directed mutagenesis, *Thermoactinomyces vulgaris*.