

УДК 577.15.086.83 : 577.21

## ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ И СОВРЕМЕННАЯ ЭНЗИМОЛОГИЯ

*Кутузова Г. Д., Дементьева Е. И., Угарова Н. Н.*

Показана роль генной инженерии для решения задач современной энзимологии. Рассмотрены методы клонирования и мутагенеза генов белков и ферментов, возможности генной инженерии для изучения структуры и функций ферментов, активного центра ферментов, установления взаимосвязи между структурой и стабильностью белковых молекул. Показана роль направленного сайт-специфического мутагенеза для исследования структуры и механизма действия ферментов, их стабильности. Изучение механизма и факторов, определяющих стабильность ферментов, с помощью аминокислотных замен открыло перспективы для белкового дизайна — создания белков с новыми, заданными свойствами, улучшенной стабильностью.

Библиография — 301 ссылка.

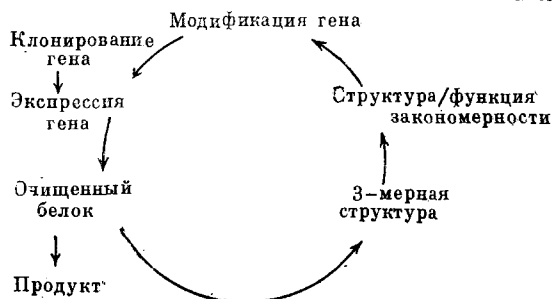
## ОГЛАВЛЕНИЕ

I. Введение	1896
II. Общие принципы биосинтеза и структурной организации белка и его гена	1897
III. Методы клонирования и мутагенеза генов прокариотических и эукариотических белков и ферментов	1902
IV. Изучение структуры и функций белков генно-инженерными методами	1905
V. Установление взаимосвязи между структурой и стабильностью белковых молекул (методами генной инженерии)	1918
VI. Белковый дизайн	1930

## I. ВВЕДЕНИЕ

Широкое развитие техники рекомбинантных ДНК привело к ее проникновению в химию белка и энзимологию и к появлению новой дисциплины — белковой инженерии. 1980-е годы называют «эрой второго пришествия» белковой химии и связывают с новым бумом в биотехнологии — белковой инженерией. Белковая инженерия — «марьяж» между фундаментальной наукой о структуре и функциях белковых макромолекул, дающей основу для направленного изменения их свойств, и методами генной инженерии, позволяющими это осуществлять. Полный цикл белковой инженерии описывается схемой [1]:

Схема 1



Генная инженерия открывает перед современной энзимологией неограниченные возможности для изучения свойств ферментов: 1) возможность быстрого установления первичной структуры белковых молекул и их генов; 2) выявление принципов сворачивания полипептидной цепи и перспективу предсказания вторичной и третичной структур белка или белкового домена; 3) изучение структуры и механизма функционирования

ния ферментов *in vitro* и *in vivo*; решение фундаментальных проблем ферментативного катализа: строение активного центра ферментов, механизм фермент-субстратных взаимодействий, типы и силы взаимодействий, энергетика процесса и т. п.; 4) установление взаимосвязи между структурой и стабильностью белковых молекул. Решение этих задач открывает блестящие перспективы для белкового дизайна (получение ферментов с заданными свойствами). Методами генной инженерии можно направленно изменять: каталитические параметры ( $k_{\text{кат}}$  и  $K_M$ ); термостабильность и температурный оптимум активности; стабильность в органических растворителях; субстратную специфичность; потребность в кофакторах; рН-оптимумы активности и стабильности; устойчивость к протеолизу; аллостерическую регуляцию; молекулярный вес и субъединичный состав.

Наконец, стало возможным создание совершенно новых белков путем синтеза генов *de novo* и их последующей экспрессии.

Все эти возможности генной инженерии для решения задач современной энзимологии и рассмотрены в данном обзоре.

## II. ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ БИОСИНТЕЗА И СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ БЕЛКА И ЕГО ГЕНА

Белок представляет собой полипептидную последовательность из остатков 20 аминокислот. За синтез каждой полипептидной цепи ответственен определенный ген в ДНК [2, 3]. Теоретические аспекты и математические модели синтеза белка рассмотрены, например, в [4]. Вновь синтезированная полипептидная цепь в клетке претерпевает посттрансляционную модификацию и компартиментализацию.

Модификация различных аминокислотных остатков (фосфорилирование, метилирование, гидроксилирование, иодирование, карбоксилирование, гликозилирование, липидирование) в белковой цепи может происходить как в то время, когда синтезируемая цепь связана с рибосомой, так и после окончания синтеза [5]. Специфические остатки, которые подвергаются модификации, определяются в одних белках последовательностью аминокислот, а в других — конформацией. Например, местами связывания карбогидратов в белках является Asp в последовательности Asp—X—Ser/Thr, где X — любой остаток, кроме Pro. На этой стадии может происходить связывание синтезированного белка с кофакторами и ионами  $M^{n+}$ , ковалентная и нековалентная сборка субъединиц, образование дисульфидных связей между полипептидными цепями и внутри их. В некоторых случаях эти процессы протекают котрансляционно. Внутримолекулярные дисульфидные связи не встречаются в молекулах внутриклеточных цитоплазматических белков. Они характерны для внеклеточных белков, физиологическое окружение и физико-химические условия которых могут сильно варьироваться и вызывать разворачивание белка [6].

У белков и ферментов, функционирующих вне клетки, в процессе прохождения через цитоплазматическую мембрану происходит отщепление сигнальной последовательности (препоследовательности) мембранными сигнальными протеазами и одновременно происходит гликозилирование белка.

Основное влияние на пространственную структуру молекулы белка оказывают свойства боковых групп составляющих ее аминокислотных остатков, которые взаимодействуют как друг с другом, так и с молекулами окружающей среды. Все аминокислотные остатки делятся на гидрофобные, гидрофильные и нейтральные (рис. 1). Отнесение остатка к той или иной группе в зависимости от критериев несколько варьируется (ср. [7] и [8]). Полностью погруженными после сворачивания белка являются гидрофобные остатки (Gly), Ala, Cys, Val, Ile, Leu, Met, Phe, Trp, а умеренно полярные остатки (Gly), Ser, Thr, His и Tyr и сильно полярные остатки (Gly), Pro, Asp, Asn, Glu, Gln, Arg, Lys являются менее погруженными: на 76 и 63% соответственно [9]. Структурная организация белка, механизм сворачивания и сборки полипептидных цепей подробно освещены в обзоре [10].

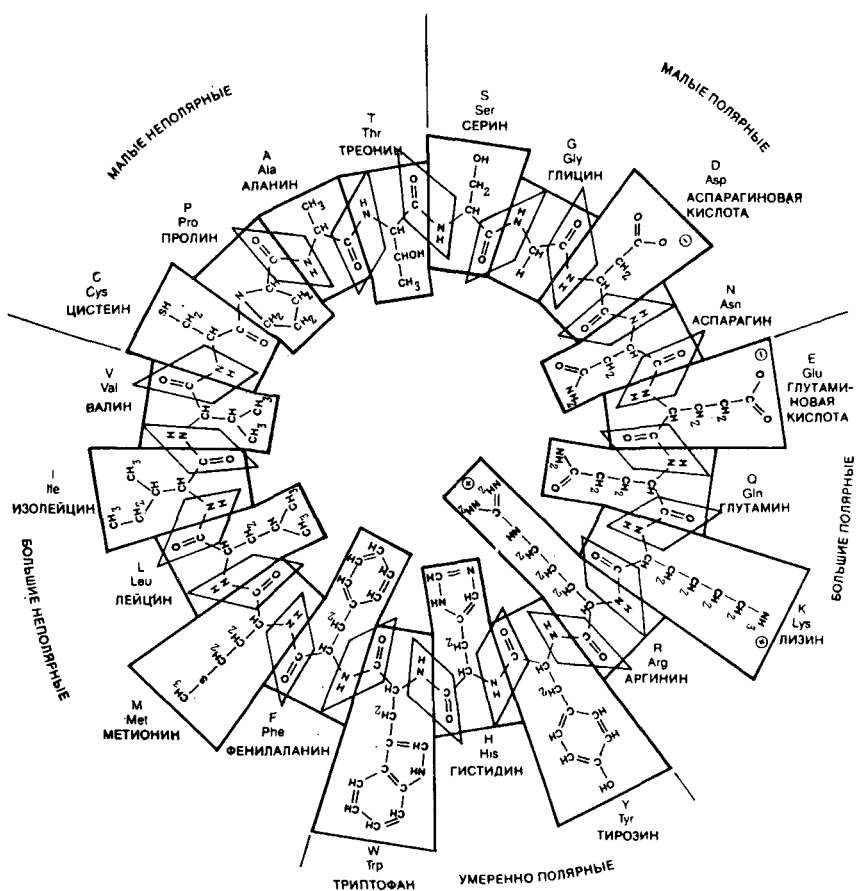


Рис. 1. Классы аминокислот, образованные по размеру и степени поляризации их боковых групп [8]

В трехмерной пространственной структуре типичного глобулярного белка внутренняя область образована в основном  $\beta$ -слоями, а поверхность —  $\alpha$ -спиралями. Каждое третье или четвертое положение в этих внешних  $\alpha$ -спиралях занимают аминокислоты с неполярными боковыми группами, направленными внутрь глобулы, а боковые группы остальных аминокислот, как правило, полярны и обращены в сторону водной среды.

Нативная молекула белка состоит из нескольких кооперативных доменов, каждый из которых при денатурации разрушается как единое целое [11]. Домен белка состоит, как правило, из комбинаций  $\alpha$ - и  $\beta$ -структурных элементов, включает в себя от 50 до 200 аминокислотных остатков и характеризуется минимальным отношением площади поверхности к объему ( $S/V$ ). Небольшие белки могут содержать лишь один домен, большие — до десятков доменов. Расчлененность на домены, являющаяся общим принципом построения белковых молекул, обеспечивает необходимую жесткость и взаимную подвижность определенных групп в белке и, по-видимому, отражает его эволюцию, которая происходила путем соединения ранее независимых небольших прабелков [12]. В настоящее время предполагается существование еще меньшей, чем домен самостоятельной единицы белковой структуры — модуля [13] — полипептидного сегмента размером 2—5 кД (30—50 аминокислотных остатков), который имеет стабильную свернутую конформацию и выполняет определенную функцию по высокоспецифичному связыванию лиганда (субстрат, аллостерический эффектор, компоненты клетки: липиды, углеводы, нуклеиновые кислоты и т. д.) [14]. Таким образом, размер белка может определяться необходимым для функционирования *in vivo* количеством различных лигандосвязывающих участков. Зная размер субъединицы фермента,

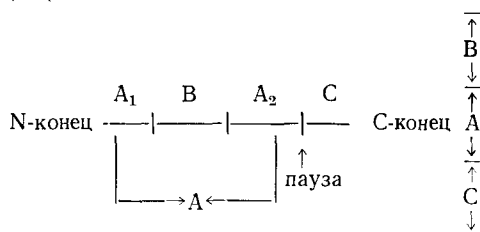
можно оценить число лигандосвязывающих участков: это отношение молекулярной массы к среднему размеру модуля  $\sim 5,2$  кД. Модули и домены можно также визуализировать с помощью кристаллографических исследований и микрокалориметрического изучения процессов денатурации. Протеолиз обычно происходит в междоменной области и позволяет разделить домены с частичным сохранением их функции, как, например, для ДНК-полимеразы на большой и малый домены, каждый из которых функционально активен [15].

Многие белки состоят из нескольких полипептидных цепей — субъединиц, как одинакового, так и различного состава, объединяемых в единый комплекс с помощью нековалентных взаимодействий или дисульфидных связей. Размер субъединицы эукариотического белка варьируется от 10 до 480 кД (средний размер — 32 кД, для прокариотического белка — 24 кД) [16]. Для 90% белков размер субъединицы меньше 60 кД. Таким образом, белок состоит из субъединиц, каждая из которых содержит домены, состоящие из модулей.

Проблема сворачивания синтезированной полипептидной цепи с образованием трехмерной пространственной структуры белка является одной из самых сложных и интригующих проблем химии белка. Согласно современным представлениям о механизме сворачивания белка, конформационная информация распределена вдоль полипептидной последовательности неравномерно, некоторые аминокислотные остатки принципиально важны для образования правильной конформации. В начале сворачивания образуются локальные обратимые структуры (центры нуклеации) — короткие участки вторичной структуры типа  $\alpha$ -спиралей или  $\beta$ -слоев. Дальнейшая стабилизация структуры происходит за счет взаимодействия соседних участков. Сворачивание начинается независимо и более или менее одновременно в нескольких областях полипептидной цепи (автономные домены сворачивания) [17]. Проблема сворачивания приобрела в настоящее время особенно большое значение в связи с получением гибридных белков при клонировании эукариотических генов в бактериях, где N-концевая часть нужного белка слита с частью прокариотического белка, что может влиять на процесс сворачивания, дестабилизируя кинетически важные промежуточные состояния эукариотического белка. Кроме того его N- или C-концевая часть может находиться внутри глобулы, тогда слитой гибридный белок не будет иметь нужную нативную конформацию, давая нерастворимые производные [17].

Для процесса сворачивания белка большое значение имеет тот факт, что в полипептидной цепи аминокислотные остатки разделены не только в пространстве, но и во времени в ходе синтеза. Важность пространственного и временного разделения аминокислотных остатков для структуры в целом зависит от относительных скоростей синтеза белка и его сворачивания. В начале синтеза сворачивание сегмента синтезированной полипептидной цепи происходит в течение микросекунд, так как предполагает взаимодействие лишь близлежащих аминокислотных остатков. В среднем, время, необходимое для полной трансляции белка среднего размера, составляет 2 мин. Сворачивание полипептидной цепи в трехмерную структуру происходит до завершения ее полного синтеза, причем возможно образование дисульфидных связей, которые потом необязательно присутствуют в зрелом белке. Последующая изомеризация дисульфидных связей приводит к правильной конформации, как было показано для панкреатического ингибитора трипсина [18]. Были получены прямые доказательства существования пауз в процессе синтеза белка, в результате чего происходит накопление специфических полипептидов [19, 20]. По механизму сворачивания полипептидной цепи *in vivo* белки можно разделить на две группы [21]: 1) белки, на правильное сворачивание которых не влияет скорость трансляции; у таких белков аминокислотная последовательность действительно содержит всю информацию, необходимую для правильного свертывания цепи (даже *in vitro*, после денатурации); 2) белки, неспособные эффективно сворачиваться в нативную конформацию *in vitro*. Это полипептиды с альтернативными кинетически

легкими путями сворачивания, которые могут образовывать искаженные, но стабильные конформации. На сворачивание таких белков *in vivo* большое влияние оказывает сам процесс трансляции, протекающий с неодинаковой скоростью и с трансляционными паузами. Наличие пауз обусловлено скоплением в цепи ДНК редко используемых кодонов и, соответственно, наличием малых количеств соответствующих тРНК, что существенно замедляет скорость доставки соответствующих аминокислот. Наличие вторичной структуры в мРНК также замедляет скорость трансляции [21]. Указанные особенности были выявлены, например, для гена пируваткиназы из дрожжей [22]. Каждая из четырех субъединиц пируваткиназы состоит из короткого N-концевого сегмента и трех различных доменов: А, В, С:



Трансляционная пауза перед началом синтеза домена С позволяет двум частям  $A_1$  и  $A_2$  образовать центральный домен А, содержащий каталитический центр, до того, как синтезируется домен С, где находится аллостерический центр пируваткиназы. Это предотвращает аномальные взаимодействия между еще несвернувшимися областями доменов А и С. Трансляционные паузы, позволяющие образоваться функционально важным доменам, были также обнаружены для Аром-белка, катализирующего биосинтез ароматических кислот [23]. Неспособность некоторых белков возвращаться в нативную конформацию после денатурации *in vitro* может указывать на важность временного разделения процессов синтеза и сворачивания различных участков полипептидной цепи *in vivo*.

Благодаря использованию методов генной инженерии в настоящее время стало возможным детальное изучение механизма сворачивания белков. Конструирование мутантных полипептидных сегментов выявляет роль отдельных аминокислотных остатков в сворачивании и сборке субъединиц ферментов [24, 25]. Для гетеродимера ( $\alpha\beta$ ) *бактериальной люциферазы* показано, что отсечение 10—15 остатков С-концевой части  $\beta$ -субъединицы не изменяет активности и стабильности фермента, но мутантный фермент не способен ресворачиваться после обработки мочевиной. Комплекс  $\alpha\beta$  субъединиц образуется сначала между не полностью свернутыми  $\alpha$  и  $\beta$ , а их окончательное сворачивание происходит в гетеродимерной форме. Если субъединицы  $\alpha$  и  $\beta$  свернулись *in vivo* по отдельности, то образование  $\alpha\beta$  невозможно без предварительной обработки мочевиной. На процесс сворачивания не влияет природа остатков в С-концевой области, однако делеции в этой области уменьшают способность  $\beta$ -субъединицы к образованию димерной структуры *in vitro* и *in vivo* [26]. Даже один аминокислотный остаток может играть ключевую роль в образовании структуры активного фермента. Введение дополнительного Met на N-конце существенно уменьшало скорость сворачивания лизоцима цыпленка, а замена Ala-31 даже на близкий по структуре Val препятствовала правильному сворачиванию белка [27]. В панкреатическом ингибиторе трипсина остатки Cys, образующие одну из трех S—S-связей, были заменены на Ala или Thr, при этом скорость сворачивания уменьшилась в 3 раза, но был получен правильно свернутый белок [28]. Таким образом, образование S—S-связей снижает активационный барьер процесса сворачивания полипептидной цепи.

Для ферментов с известной трехмерной пространственной структурой и структурой гена важные выводы были получены при сопоставлении этих структур [29]. Известно, что гены эукариотических белков не являются непрерывными, а состоят из кодирующих участков — экзонов — не-

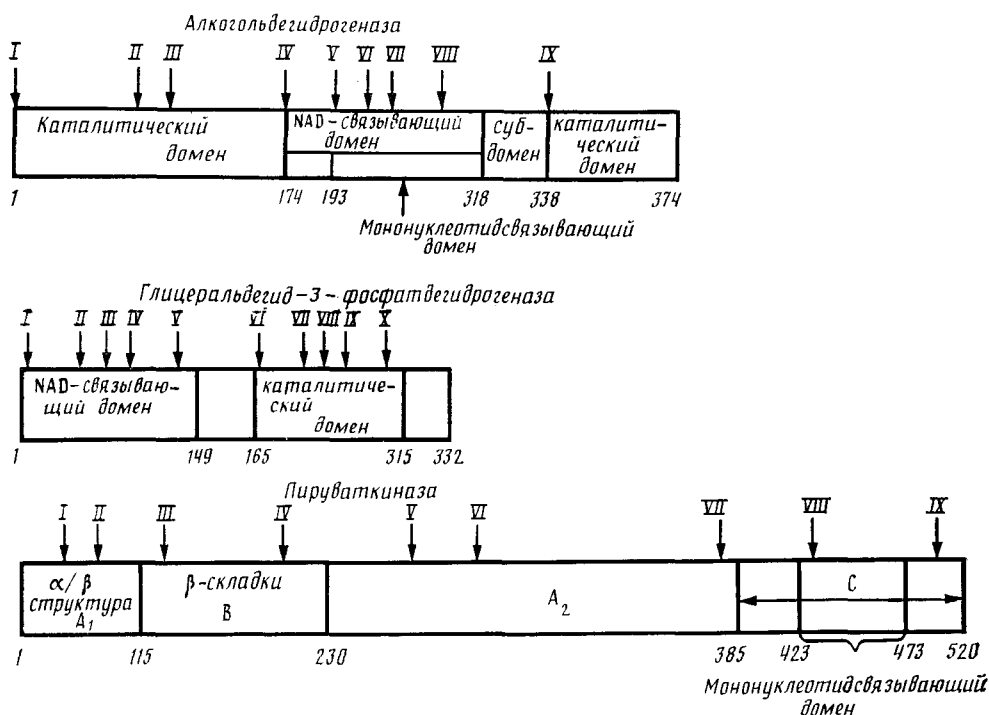


Рис. 2. Диаграмма положения интронов (римские цифры) и границ доменов вдоль полипептидной цепи субъединиц ферментов [29]; арабские цифры указывают положение остатков в аминокислотной последовательности

кодирующих — интронов. Было высказано предположение, что положение интронов в гене соответствует границе домена в белке. Например, субъединицы НАД-зависимых дегидрогеназ содержат два структурно и функционально различных домена. Один связывает кофермент, на другом находятся субстратсвязывающий и каталитический участки. НАД<sup>+</sup>-Связывающие домены алкогольдегидрогеназы (АДГ), глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ГАФД) и лактатдегидрогеназы (ЛДГ) имеют сходную структуру и связывают кофермент сходным способом, тогда как каталитические домены не имеют гомологии и имеют абсолютно различные структуры [30]. Структура доменовсодержащих субъединиц и положение интронов для этих ферментов представлена на рис. 2. Интроны 6 и 9 для АДГ, 5 и 6 для ГАФД и 3 и 7 для пируваткиназы (ПК) разделяют каталитический и нуклеотидсвязывающий домены. Каждый нуклеотидсвязывающий домен может быть грубо разделен на две идентичные единицы, которые относятся к мононуклеотидсвязывающей области и разделяются интронами. Это подтверждает гипотезу [31] о том, что мононуклеотидсвязывающий домен — основной блок для создания ферментов, чья функция определяется способностью связывать нуклеотиды.

Однако на примере гемоглобина [32], карбоксипептидазы [33] и антитрипсина [34] показано, что положение интронов в генах эукариотических белков не всегда соответствует границам между известными доменами. Более того, в генах прокариот интроны не обнаружены. Предполагается, что они элиминировались в целях экономии генетического материала [8]. В то же время внутри одного домена может встречаться несколько интронов (рис. 2). Анализ генов 80 белков [35] показал, что на 70% размер экзонов варьируется от 52 до 223 пар нуклеотидов, это соответствует размерам модулей в белках [13]. По-видимому, интроны отделяют не только домены, но и модули белков с определенными лигандсвязывающими функциями. Был предложен алгоритм нахождения границ модулей и доменов [36]. Многие экспериментальные факты подтверждают эту гипотезу.

### III. МЕТОДЫ КЛОНИРОВАНИЯ И МУТАГЕНЕЗА ГЕНОВ ПРОКАРИОТИЧЕСКИХ И ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ БЕЛКОВ И ФЕРМЕНТОВ

Методы клонирования генов белков и ферментов из различных источников, экспрессии генов в разных системах-хозяевах подробно описаны во многих учебниках и практических руководствах [3, 37—39]. Клонирование ДНК генов прокариотических белков принципиально отличается от клонирования генов белков из эукариотических организмов. ДНК простейших организмов представляет собой совокупность генов, кодирующих белки и ферменты, следующих друг за другом. Первой стадией при ее клонировании является выделение геномной ДНК, расщепление ее на фрагменты и их включение в ДНК-векторы. Общие этапы клонирования ДНК в плазмидном векторе *E. coli* представлены на рис. 3. Трансформация клеток *E. coli* проводится кольцевыми рекомбинантными молекулами ДНК. Клетки рассеивают затем таким образом, что из каждой клетки вырастает одна колония, содержащая популяцию идентичных дочерних молекул — клон. Из нескольких тысяч клонов (библиотеки) находят один или несколько клонов, содержащих нужный встроенный фрагмент ДНК. Для скрининга колоний используют специфический радиоактивно-меченый зонд — пробу, позволяющую просматривать библиотеку клонов. Зондом может являться чистая или частично очищенная мРНК, химически синтезированный олигонуклеотид, которые гибридизуются с соответствующей последовательностью гена в геномной библиотеке. Для идентификации колоний также часто используют антитела к белкам, гены которых необходимо обнаружить.

Гены белков эукариот включают в себя некодирующие участки — интроны, поэтому для клонирования эукариотических белков используется кДНК — ДНК, комплементарная матричной (информационной) РНК или химически синтезированный ген, не содержащий интронов. Первой стадией при клонировании белков эукариот является выделение мРНК, на основе которой синтезируют двухцепочечную кДНК, далее включают ее в клонирующий вектор и используют для трансформации клеток хозяина (рис. 3).

Генно-инженерные методы, используемые для мутагенеза, можно разделить на два больших класса. К первому классу относится получение случайных точечных мутаций в нужном гене. Классический метод мутагенеза с отбором мутантных форм по какому-либо заранее выбранному свойству до сих пор широко применяется для получения ферментов-мутантов, отличающихся от ферментов дикого типа по каталитической активности, субстратной специфичности или стабильности. Мутантный ген получается также, когда ДНК в виде изолированного фрагмента или как компонент одноцепочечного или двухцепочечного ДНК-вектора модифицируют с помощью химических реагентов или ферментов. На второй стадии модифицированную ДНК используют для трансформации бактериальных клеток и изолируют индивидуальные клоны. Далее мутантную рекомбинантную ДНК выделяют из множества клонов и определяют последовательность нуклеотидов в мутантном гене. Охарактеризованный мутантный ген используют для трансформации клеток хозяина (бактерии, дрожжи, реже животные или растительные клетки), в которых он транскрибируется и транслируется, давая мутантный белок [40, 41]. Во второй класс входят все методы, позволяющие получить специфические, заранее выбранные мутации. Классификация современных методов мутагенеза приведена в табл. 1.

Наиболее точным и удобным методом введения мутаций в клонированные фрагменты ДНК является сайт-специфический мутагенез с использованием синтетических олигонуклеотидов. Большое количество работ, посвящено усовершенствованию этого метода [50—58], в частности, повышению выхода мутантных форм [55, 59—63]. Сайт-специфический мутагенез широко используется для изучения взаимосвязи между структурой и функциями белков и ферментов, создания белков с новыми свойствами.

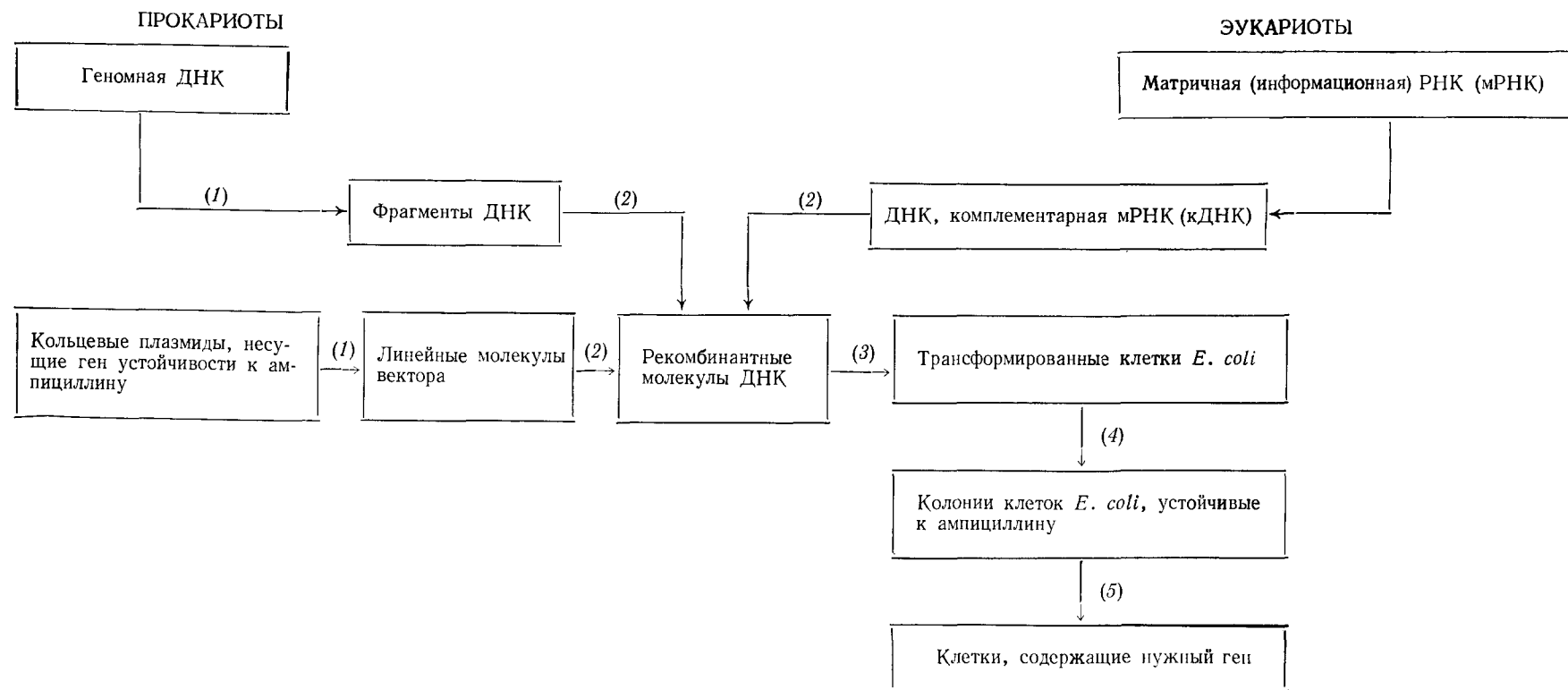


Рис. 3. Основные этапы клонирования прокариотической и эукариотической ДНК в клетках *E. coli* [3, 37, 38]: (1) — расщепление ДНК с помощью рестриктазы; (2) — сшивание молекул ДНК с помощью ДНК-лигазы; (3) — трансформация клеток *E. coli* рекомбинантными плазмидами; (4) — отбор колоний *E. coli*, содержащих рекомбинантные плазмиды, по устойчивости к ампициллину; (5) — скрининг библиотеки клонов с помощью радиоактивного зонда



## Классификация методов мутагенеза

Название	Сущность метода	Примечания	Ссылки
Случайные мутации			
Химические методы	Обработка гена химическими реагентами-мутагенами (бисульфит натрия, гидразин, азотистая кислота и др.) Получение одноцепочечной ДНК, достраивание второй цепи ДНК с помощью ДНК-полимеразы в присутствии 4-х дезокси-нуклеотидов, один из которых заменен на аналог	Происходит модификация оснований нуклеотидов, приводящая к мутации	[40—46]
Ферментативные методы			
Специфические, заранее выбранные мутации			
Синтез гена. Полный синтез гена	Конструирование гена из множества сегментов химически синтезированных олигонуклеотидов	Частота мутаций приближается к 100%, однако метод трудоемок, сейчас применяется редко	[42, 47, 48]
Частичный (кассетный) синтез гена	Выделение гена, вырезание по сайтам рестрикции сегмента ДНК и замена его синтетическим олигонуклеотидом, содержащим мутацию	—	[40, 42, 49]
Делеции и вставки при разрыве двухцепочечной ДНК	Получение линейной молекулы ДНК, удаление фрагментов, находящихся между сайтами рестрикции (делеции), достройка нуклеотидной цепи (вставки)	—	[38, 42]
Сайт-специфический олигонуклеотиднаправленный мутагенез	Синтетический олигонуклеотид (10—20 оснований), содержащий мутацию, гибридизуется с одноцепочечной ДНК, и используется как праймер для синтеза второй цепи ДНК. Достроенная цепь замыкается с помощью ДНК-лигазы, полученной ДНК трансформируют клетки <i>E. coli</i> , где происходит репликация ДНК с образованием двух форм клонированного гена: дикого типа и утантного (рис. 4)	Мутантная форма может быть легко идентифицирована с использованием того же нуклеотида, меченного <sup>32</sup> P	[40—42, 47, 50—55]

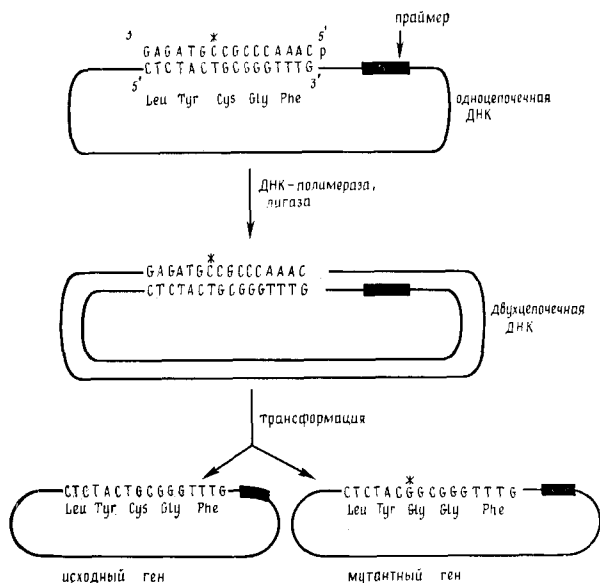


Рис. 4. Схема олигонуклеотид направленного мутагенеза [55]; звездочкой отмечен мутантный нуклеотид

#### IV. ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРЫ И ФУНКЦИЙ БЕЛКОВ ГЕННО-ИНЖЕНЕРНЫМИ МЕТОДАМИ

##### 1. Первичная структура белка и ее эволюция

Ранее первичную структуру белка определяли только методом секвенирования с помощью автоматических аминокислотных анализаторов. При этом необходимо было иметь значительные количества белка высокой степени чистоты, что не всегда оказывалось возможным. С помощью методов генетической инженерии стало возможным выделение ДНК и определение полной нуклеотидной последовательности гена, кодирующего данный белок. Методы секвенирования ДНК (метод Максама — Гилберта, метод Сэнгера) [3, 37, 38, 64, 65] позволили относительно просто и быстро определять последовательность оснований нуклеотидов в гене. С помощью генетического кода легко устанавливают затем последовательность аминокислот в белке. Трудность заключается в необходимости безошибочной идентификации последовательности огромного количества оснований (белок, состоящий из 1000 аминокислот, кодируется 3000 оснований), а также в правильном определении начала считывания кода. Делеция одного основания может привести к сдвигу рамки считывания и, следовательно, к неправильному определению всей аминокислотной последовательности. Чтобы избежать таких ошибок, можно, например, определить аминокислотные последовательности коротких участков на N- и C-концах белка другим методом, сравнить их с последовательностью, полученной из нуклеотидной последовательности гена. Для проверки правильности считывания последовательности оснований ДНК сопоставляют также молекулярную массу, измеренную масс-спектрометрически, для триптических пептидов, полученных из изучаемого белка, со структурой этих пептидов, выведенной из последовательности ДНК [66].

К настоящему времени известны первичные структуры более 3700 белков, определенные разными методами [67]. С развитием методов генной инженерии число белков и ферментов с установленной первичной структурой значительно возросло (рис. 5). На примере некоторых ферментов рассмотрим, какую информацию о структуре самого фермента и его активного центра можно получить только из анализа последовательности нуклеотидов в гене и из сравнения ее с аминокислотной последовательностью изучаемого белка.

Клонирование и секвенирование генов позволило установить наличие сигнальных пептидов у секретируемых белков: цитохрома  $c_3$  из *Desulfovibrio vulgaris* [68], протеазы III [69] и пенициллин G-ацилазы [70] *E. coli*, хлорпероксидазы [71]. Сигнальные пептиды способствуют транс-

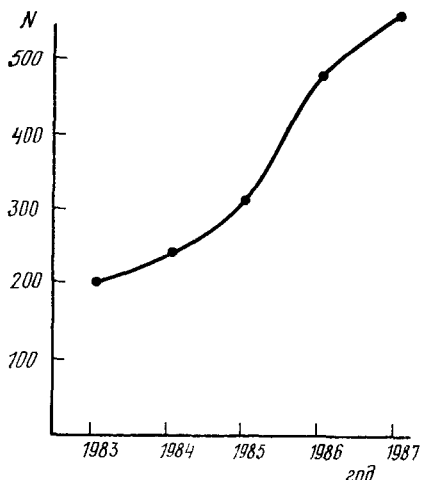


Рис. 5. Число публикаций (по годам) по определению аминокислотной последовательности ферментов геноинженерными методами (подсчитано нами)

мембранному переходу белков из периплазмы бактерий и дрожжей и отщепляются сразу же после секреции, поэтому установление нуклеотидной последовательности генов является хорошим методом обнаружения сигнальных пептидов и изучения их структуры. Сравнение аминокислотной последовательности белка и последовательности нуклеотидов гена показывает, подвергался ли данный белок посттрансляционной модификации. Например, акварин синтезируется в виде предшественника. В ходе трансляции происходит отщепление семи N-концевых остатков [72]. N-Концевым остатком человеческой креатинкиназы М является лизин, остаток метионина отделяется после трансляции [73].

Установление аминокислотной последовательности дает возможность сделать некоторые выводы о наличии доменов, структуре субстратсвязывающих участков. Анализ структуры гена пенициллинацилазы выявил 4 струк-

турных домена по положению интронов: нуклеотиды 1—78 кодируют сигнальный пептид, 79—705 —  $\alpha$ -субъединицу, 708—867 — пептид, ковалентно связывающий две субъединицы, 868—2538 —  $\beta$ -субъединицу [70]. Мультидоменная структура установлена также для тяжелой цепи калпактина (субстрата вирусной протеин-тирозинкиназы) [74], калпастатина (ингибитора  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимого калпаина) [75]. Изучение структуры генов диглицеридсинтетазы и диглицеридгидролазы *E. coli* показало, что первый фермент является чрезвычайно гидрофобным мембранным белком [76]. Второй фермент менее гидрофобен, но на его N-конце расположен очень гидрофобный домен, осуществляющий связывание гидролазы с мембраной [77]. В состав биолюминесцентного  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимого белка акварина входят 3 гидрофобных участка, которые, возможно, ответственны за связывание его функционального хромофора, коэлентеразина (люциферина), и 3 участка для связывания ионов  $\text{Ca}^{2+}$  [72]. В случае  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-азы на основе анализа первичной структуры высказаны предположения о характере расположения этого фермента на мембране [78].

Сравнение первичной структуры изучаемого фермента со структурой белков, сходных с ним по своей функции, позволяет выявить общие функциональные участки. Из анализа аминокислотных последовательностей акварина и других  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающих белков (кальмодулин, парвальбумин и тропонин С) выявлены три  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающих участка в полипептидной цепи акварина [72]. Важная информация о структуре активного центра люциферазы бактерий получена при сравнении первичной структуры люцифераз из разных источников: *Vibrio fischeri*, *Vibrio harveyi*, *Photobacterium leiognathi* и *P. phosphoreum* [79]. Из данных по модификации SH-группы цистеина-106 в люциферазе *V. harveyi* было предположено, что эта группа участвует в катализе. Однако у люцифераз из других источников в положении 106 находится валин. Таким образом, SH-группа Cys-106 не важна для проявления активности люциферазы бактерий. Участки  $\alpha$ -субъединицы 115—117 и 280—282, одинаковые для всех рассмотренных бактериальных люцифераз и расположенные близко друг от друга в трехмерном пространстве, по-видимому, составляют значи-

тельную часть активного центра [39]. Сравнение первичных структур липаз из различных источников (бактерий и поджелудочной железы свиньи) показало, что в активный центр входит Ser-83 [80].

Сходные аминокислотные последовательности обнаружены для глутатион S-трансфераз из печени человека и крысы (гомология 50%) [81], каталазы *T* дрожжей *S. cerevisiae*, бактерий *Penicillium vitale* и печени быка (гомология 52,2%) [82], гидроксилаз ароматических аминокислот — триптофан-, фенил- и тирозингидроксилазы (гомология 60%) [83], валил-тРНК-синтетазы из *B. stearothermophilus* и изолейцил-тРНК-синтетазы *E. coli* [84], для пяти аденилаткиназ из различных источников [85]. Это означает, что данные о пространственной структуре и механизме действия одного фермента можно использовать при изучении фермента с гомологичной последовательностью. Для биоптеринзависимых гидроксилаз ароматических аминокислот структура гомологична примерно для  $2/3$  молекулы, считая с С-конца, на N-концах гомологии не наблюдается. Это подтверждает гипотезу, что С-концевые домены гидроксилаз определяют их каталитические свойства (сходный механизм катализа), а  $1/3$  молекулы, начиная с N-конца составлена из доменов, определяющих субстратную специфичность [83]. На основе установления гомологии с другими белками обсуждается соотношение между структурой и функцией человеческой М креатинкиназы [73],  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-азы [86], тяжелой цепи калпактина [74], гликогенфосфорилазы [87], глутатион S-трансферазы [81], дрожжевой каталазы *T* [82], триптофангидроксилазы [88].

В последние годы стало возможным изучение эволюции белка в связи с развитием техники рекомбинантных ДНК, установлением первичных структур для огромного числа белков и успехами кристаллографии. Для ряда белков с известной кристаллической структурой были найдены общие домены. Следовательно, если какой-либо структурный элемент оказывался полезным для выполнения определенной функции, он непременно использовался в различных белках. Так, например, Россман [30] обнаружил в ряде ферментов неизменный домен, состоящий приблизительно из 70 аминокислотных остатков. Эти ферменты сильно отличались друг от друга по своим функциям, но имели общее свойство: они связывали коферменты типа — NAD, FMN или AMP, которые имели общую часть — мононуклеотид. По-видимому, этот домен является прабелком для большого числа нуклеотидсвязывающих ферментов, поскольку его функция оказалась жизненно важной. Первые, способные осуществлять какие-либо функции белки были невелики по размеру и обладали свойством специфически связывать другие молекулы. При объединении двух таких белков могла возникнуть примитивная каталитическая система, которая совершенствовалась и развивалась в процессе эволюции. С точки зрения Гилберта [89], экзоны — геномные эквиваленты белковых доменов, которые использовались для сборки первых белков и поддерживаются в ходе эволюции генетически изолированными на протяжении нескольких миллиардов лет. Непрекращающиеся процессы перестановки и реорганизации доменов в новые комбинации порождали новые белки, в числе которых и появились полезные конструкции. Суть гипотезы заключается в том, что основу эволюции белков составляла перетасовка экзонов, кодирующих домены [8].

Основной механизм эволюции белков — это дупликация генов, которая заключается в том, что в геноме клетки возникают две или более копии одного и того же гена. Одна из копий сохраняет прежнюю функцию, так что в организме не происходит изменений, другая копия может подвергаться мутациям. Доказательством дупликации генов является существование субъединичных ферментов с неидентичными, а гомологичными субъединицами, гомологичных белков, содержащих одну полипептидную цепь, как у протеаз серин-гистидин-аспарагинового типа с различной субстратной специфичностью.

Другим примером дупликации генов являются трипсин, химотрипсин А, эластаза. Гомология их последовательностей составляет примерно

40%. У них аналогичная функция — гидролиз белков, но изменения коснулись типа гидролизуемой связи. Изменения остатков произошли в активном центре: у трипсина — Asp, у химотрипсина — Ser. Анализ трехмерных структур этих ферментов показал, что сериновые протеазы состоят из двух сходно свернутых доменов, симметрично расположенных вокруг оси 2-го порядка [90]. В каждом случае интроны отделяют кодоны каталитических триад (Asp, Ser и His), но основная часть экзонов одинакова внутри этого класса ферментов.

В cAMP-, cGMP- и  $\text{Ca}^{2+}$ -калмодулинзависимых протеинкиназах и фосфорилэстеразах домены, выполняющие аналогичную функцию, гомологичны: например cAMP- и cGMP-связывающие области в регуляторных субъединицах находятся в гомологичных доменах. Каталитические (АТР-связывающие) области во всех протеинкиназах также встречаются в гомологичных доменах [91]. Эти белки произошли в результате дупликации и слияния генетических элементов двух родственных семейств, что определило аллостерическую природу этих ферментов [92]. Возможно, что аллостерическая регуляция возникла вначале из случайного взаимодействия активного фермента с ингибитором, и ассоциация была ослаблена ковалентной модификацией комплекса, например фосфорилированием, аденилированием и т. д. [88].

Для эволюции гена калмодулина [93] предложена модель, включающая тройную дупликацию гена-предшественника с образованием гена прототипа современного калмодулина и добавление к обоим концам гена некодирующих сегментов. Последняя стадия произошла относительно недавно, так как размеры и нуклеотидные последовательности сегментов на 3'- и 5'-концах сильно различаются для генов различных калмодулинов.

Помимо дупликации генов может происходить их слияние, в результате чего белок становится в два раза длиннее. Примером этого могут служить иммуноглобулины, которые произошли от общего предшественника — полипептида, состоящего из 110 аминокислотных остатков. После дупликации и слияния различные части иммуноглобулиновых цепей приобрели различные биологические функции [2].

Изучение эволюции белков можно вести в двух аспектах:

1) Анализ изменений структуры одного и того же белка в различных организмах в ходе эволюции. Например, сравнение структур цитохрома *c* от дрожжей до человека (более 80 видов) показывает, что близкородственные цитохромы почти не различаются, либо различаются малым числом остатков. Наибольшие различия в аминокислотном составе характерны для цитохрома *c* из низших и высших организмов. Для белков близкородственных видов характерны консервативные замены, при которых аминокислота в последовательности заменяется другой, сходной по свойствам и строению, так что пространственная структура белка не нарушается и не возникает замен в области активного центра, а также замен, вызывающих сильные конформационные изменения в белке, что может привести к потере активности. Известна значительная толерантность по отношению к заменам, делециям и вставкам аминокислот на многих участках полипептидной цепи в различных белках [2]. Обнаружена гомология вблизи остатков Cys среди триптофан-, фенил- и тирозингидроксилаз из различных источников. Предполагается, что они произошли от одного гена в результате накопления точечных мутаций [83]. По мере перехода от низших организмов к высшим белок становится более сложным. Фосфофруктокиназа из бактерий имеет один регуляторный участок, а фермент человека — большего размера — содержит три регуляторных участка и дополнительно может связывать три различных типа регуляторных белков [13]. В предельном случае может оказаться, что аминокислотные последовательности двух белков, обладающих близкой пространственной структурой, настолько сильно различаются, что трудно установить их эволюционное родство.

2) Сравнение различных белков в рамках одного вида. Для ферментов, катализирующих аналогичные реакции, часто характерна гомология

первичной структуры. Например, для глутатионредуктазы и липоамидредуктазы гомология достигает 40%. При сравнении аминокислотных последовательностей любых белков следует ожидать совпадения не менее 5%, что следует из теории вероятности.

При сравнении первичных структур необходимо учитывать возможные делеции и вставки. Наибольший интерес представляют случаи, когда с их учетом в последовательностях обнаруживается от 15 до 25% совпадений. В этой «промежуточной» зоне следует искать корни генеалогического древа белков. Так, например, было установлено родство для пяти белков с различными биологическими функциями: антитромбина III, белка, содержащегося в плазме крови и нейтрализующего действия тромбина,  $\alpha_1$ -антитрипсина — ингибитора протеиназ, овальбумина — компонента яичного белка, ангиотензина — предшественника пептидного гормона, участвующего в регуляции артериального давления, и белка из ячменного зерна с неизвестной функцией [8].

Структурное сходство при отсутствии гомологии в последовательности обнаруживают лизоцим куриного белка и лизоцим бактериофага T4, что предполагает наличие общего предшественника [94].

Исследования эволюции белка дают мощный толчок развитию белковой инженерии на уровне ДНК, поскольку перегруппировки, делеции или вставки экзонов могут давать новые комбинации доменов и модулей, т. е. белки с совершенно новыми свойствами.

## 2. Предсказание пространственной структуры и функций белковых молекул

Сравнение аминокислотных последовательностей служит основой для моделирования белка на всех уровнях белковой структуры — вторичная структура, структура доменов, четвертичная, взаимодействие с лигандами и предсказание биологических функций белка [95—110]. Подходы к предсказанию структуры белка из данных по его первичной структуре можно представить в виде схемы (табл. 2).

Методы и критерии для сравнения различных белков, моделирования структуры белка рассмотрены в работах [96, 98—106].

Сравнение последовательностей белков с целью выявления гомологичных участков проводится с применением стандартных программ для анализа аминокислотных последовательностей и компьютерной графики. Созданы специальные банки данных известных первичных аминокислот-

Таблица 2

Предсказание структуры белка из данных по его первичной структуре

Структура белка	Совокупность методов предсказания
<div> <div>Аминокислотная последовательность</div> <div>↓</div> <div>Вторичная структура</div> <div>↓</div> <div>«Супер-вторичная» структура</div> <div>↓</div> <div>Домен</div> <div>↓</div> <div>Совокупность доменов, совокупность субъединиц</div> </div>	<div> <div>Предсказание структуры отдельных участков белков, нахождение «структурных мотивов» (<math>\alpha</math>-или <math>\beta</math>-спирали, случайный клубок и др.)</div> <div>Поиск «структурных матриц», моделирование пространственного расположения структурных мотивов</div> <div>Упрощенные энергетические расчеты, минимизация энергии и молекулярная динамика</div> <div>Более тонкие энергетические расчеты, моделирование пространственного расположения доменов и субъединиц с помощью компьютерной графики</div> </div>

ных последовательностей, например банк данных национального биомедицинского исследовательского общества в США (NBRF)<sup>1</sup>.

Для предсказания вторичной и третичной структур белков существует несколько путей. Первый наиболее простой и широко используемый метод — нахождение гомологичных белков с известной пространственной структурой. Для построения пространственной модели исследуемого белка на основе структурной гомологии с уже известными белками разработаны специальные программы, например, созданная Джонсом еще в 1978 г. программа Frodo [107], программа Composer [103]. Последняя основана на одновременной суперпозиции структур различных белков, гомологичных моделируемому белку и выведению усредненной структуры или «матрицы».

Основой для сравнения аминокислотных последовательностей и нахождения аналогий между ними служат следующие критерии: идентичность последовательности аминокислот, идентичность последовательности нуклеотидов, минимальное изменение оснований в кодоне, отношение числа измененных аминокислот к их общему количеству, некоторые характеристики аминокислотных остатков, например, полярность, гидрофобность и др. Аргос [100] разработал метод нахождения слабых аналогий в последовательностях белков, установил два чувствительных критерия для их сравнения: 1) относительный вес аминокислот, подвергшихся замене (критерий Дэйхофа); 2) сопоставление пяти физических характеристик аминокислотных остатков, таких, как гидрофобность, объем, коэффициент преломления, расположение остатка на участках поворота цепи или участках, антипараллельных цепи. Автор рассмотрел 30 классов белков, включающих гемоглобины, химотрипсин, лизоцимы, цитохромы *b* и *c*, триозофосфатизомеразу, лактатдегидрогеназу, домены различных белков, выполняющих одну и ту же функцию — Са-связывающие, арабинозо-связывающие и др. Все эти белки обладают сходной третичной структурой. Если для исследуемого белка гомологии с другими белками не обнаруживается, то некоторую информацию о его вторичной и третичной структуре можно получить из анализа структуры эволюционно близких белков. При отсутствии гомологии пользуются также рядом других методов установления вторичной и третичной структуры. Например, построение профиля гидрофобности и сравнение с профилями гидрофобности других белков позволяет идентифицировать участки, образующие вторичную структуру. Исследованы структурные профили серии белков с разной степенью гомологии первичных структур, и показано, что одинаковые структурные профили могут означать одинаковую трехмерную структуру даже при отсутствии гомологии аминокислотных последовательностей [108, 109]. В случае отсутствия гомологии существуют также другие способы предсказания третичной структуры белков, например, расчеты энергетических состояний белковой молекулы, поиск конформации, обладающей минимальной свободной энергией в системе белок — растворитель, и также с помощью матриц: у белков с разными первичными структурами могут существовать участки, сходные по структуре; так, нуклеотидсвязывающий домен у нескольких белков состоит из параллельных  $\beta$ -складок, ограниченных  $\alpha$ -спиралями [106].

Наконец, на основе первичной структуры можно сделать вывод о принадлежности белка к какому-либо функциональному классу [110]. Клейном были проанализированы имеющиеся в NBRF-базе данных 2145 аминокислотных последовательностей и разделены на 26 функциональных классов. При анализе использованы такие физико-химические характеристики белка, как средняя гидрофобность, максимальная гидрофобность, вариации гидрофобности отдельных сегментов, заряд, вероятность образования  $\alpha$ - или  $\beta$ -спирали, периодичность появления глицина, фенилаланина, пентапептида Phe-His-Phe-His-Trp. Оказалось, что трех-пяти характеристик достаточно, чтобы с большой вероятностью отнести белок к одному из 26 классов. Эти классы включают коллаген,

<sup>1</sup> NBRF — National Biomedical Research Foundation.

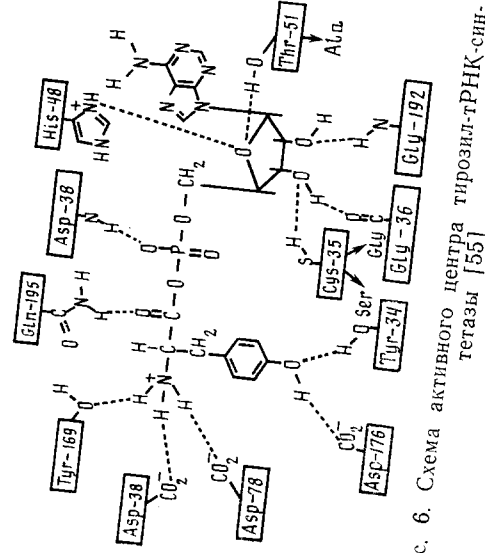


Рис. 6. Схема активного центра тирозил-тРНК-син-  
тетазы [55]

нитрогеназы, цитохромы (отдельно *b*, *c*<sub>3</sub>, *c*<sub>1</sub> и *c*), карбоангидразы, рибонуклеазы, АТР-азы, кератины, фосфолипазы, гормоны, дегидрогеназы, класс пролактин и соматотропина, ферредоксина, токсина, гистоны, глобины, вариабельные участки антител и неиммунные участки антител. Для класса коллагенов характерна периодичность появления глицины, в первичной структуре, для глобинов — периодичность появления глицина, участков, для АТР-аз — низкая склонность к образованию гидрофобных для вариабельных участков антител — сильное различие в гидрофобности отдельных сегментов полипептидной цепи.

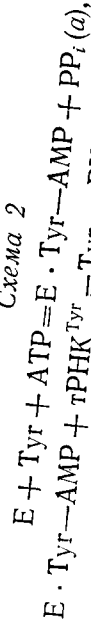
Знание первичной и пространственной структуры белка или ее моделирование на основе сравнения с ранее изученными белками, данные по химической модификации белков и ферментов и по изучению активной области центра ферментов различными методами позволяют перейти к инженерной инженерии — сайт-специфическому мутагенезу.

### 3. Изучение активного центра ферментов с помощью сайт-специфического мутагенеза

Исследования белков методом сайт-специфического мутагенеза можно условно разбить на две группы: сайт-специфический мутагенез с помощью мутагенез ферментов с известной кристаллической структурой и сайт-специфический мутагенез ферментов с неизвестной пространственной структурой. В первом случае пространственная модель фермента служит основой для направленного изменения структуры белковой молекулы и сказания результатов мутационных замен с помощью компьютерной графики. Если кристаллическая структура белка неизвестна, основной для мутаций служат данные по химической модификации, основной структур и свойств гомологичных и эволюционно близких видов. В этом случае результаты мутаций обычно носят случайный характер, и сравнение раздо труднее добиться желаемого изменения каталитических свойств или стабильности исследуемого белка.

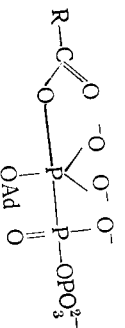
а) Сайт-специфический мутагенез ферментов с известной пространственной структурой.  
*Тирозил-тРНК-синтетаза* [55, 111—128] (из *Bacillus stearothermophilus*) катализирует двухстадийную реакцию аминацилирования тРНК<sup>Тур</sup>:

Схема 2



Анализ пространственной структуры комплекса *E*·Тур—АМР показал, что, возможно, существует водородная связь между SH-группой Cys-35



[illegible]

При каталлизе тирозина натриевым солью тирозина при нуклеофилном замещении

Од О

γ-Фосфатная группа промежуточного соединения может взаимодействовать с боковыми цепями Thr-40 и His-45. Сайт-специфический мутагенез (замена Thr-40→Ala, His-45→Glu) позволил ответить на вопрос о том, по какому механизму осуществляется увеличение энергии комплекса в фатсывязывающей области фермента увеличивается уровень фермент-переходного состояния, в то время как энергетические уровни фермент-субстратных комплексов не меняются [113, 114]. Основными группами участвующими в катализе, являются Thr-40 и His-45, но также важный центр: Tyr-34, Cys-35, His-48, Thr-51, Tyr-169 [114—118]. Сравнение профилей свободной энергии для мутантного и исходного фермента показывает, что изменение энергии связывания влияет на константу скорости и равновесные константы. Основной вывод, сделанный из изучения кинетических свойств мутантов и сравнения профилей свободной энергии, следующий: тирозил-тРНК-синтетаза (в противоположность киназам, стабилизирующим переходного комплекса) при катализе использует энергию стабилизации переходного и кислотно-основному катализу), ет механизмы стабилизации нуклеофильному и кислотно-основному катализу, ноность ковалентному, происходит за счет водородных связей и электростатических взаимодействий [114—122]. Замена остатков Lys и Arg, расположенных на обеих сторонах субстратсвязывающего кармана, отрицательно влияет на каталитическую активность фермента. Исследования показали, что во время катализа заряженные боковые цепи нейтрализуют отрицательный заряд фосфата в переходном состоянии при образовании ковалентного соединения.

Метод сайт-специфического мутагенеза применен также для изучения влияния взаимодействия с N-концевым (каталитическим) доменом одной субъединицы и с C-концевым участком — другой. Мутация Rhe-164→Lys — к возникновению положительного заряда. Введение мутации в зону взаимодействия субъединиц позволило путем изменения pH управлять субъединичными взаимодействиями [139, 140]. Цитохром c-пероксидаза [139, 140]. Цитохром c-пероксидаза — железосодержащий белок, участвующий в окислительном фосфорилировании. С помощью мутагенеза

Питохромы [129—138] и цитохромы гемодержащих белков синтезазе. С по хромы — ряд сходных по структуре гемодержащих белков, различающихся в переносе электронов на большие расстояния

мощью сайт-специфического мутагенеза была выяснена роль в переносе электрона остатков, консервативных для всех цитохромов. По рентгеноструктурным данным Phe-87 расположен на поверхности глобулы на расстоянии 5 Å от гема. Этот остаток в *изо*-1-цитохроме *c* из дрожжей был заменен на Ser, Gly и Tyr [129—131] и Leu [132]. Мутанты сохраняли 20—70% активности по сравнению с нативным белком, но потенциал восстановления уменьшился на 50 мВ. Таким образом, Phe-87 непосредственно не участвует в переносе электрона, но обеспечивает гидрофобное окружение гема и определяет высокий восстановительный потенциал цитохрома *c*. Мутации Phe-87 вызвали конформационные изменения в белковой глобуле цитохрома *c*, на что указывают изменения в спектрах КД в области полосы Soret (385—445 нм). Мутации консервативного Glu-66 у цитохрома *c* митохондрий лошади привели к выводу, что: 1) он вносит вклад в стабилизацию активной конформации белка, возможно, путем образования солевого мостика; 2) участвует в связывании АТФ [133]. Замены остатка Cys-102 на поверхности *изо*-1-цитохрома *c*, который редко встречается в других цитохромах, не привели к изменению свойств белка [135, 136]. Участки, сохраняющиеся в ходе эволюции, не всегда вовлечены в механизм электронного переноса. Например, замена консервативного Lys-77 на Arg в *изо*-1-цитохроме *c* из дрожжей не повлияла на его взаимодействие с цитохромом *b<sub>2</sub>*, цитохром *c*-пероксидазой и цитохром *c*-оксидазой [134].

Для выяснения роли участков полипептидной цепи в функционировании цитохрома Р 450 были получены химерные белки из цитохрома Р450с путем замены центрального участка, или С-концевого участка, или обоих участков соответствующими участками цитохрома Р 450d [137]. Цитохром Р450ccd обладал более высокой монооксигеназной активностью, чем исходный цитохром Р 450с, а мутант Р 450cdd — более низкой активностью. Субстратная специфичность мутантов не изменялась. Отсюда сделан вывод, что центральный участок цитохромов Р 450с и Р 450d участвует в связывании субстратов, а С-концевые участки играют важную роль в переносе электрона [137]. Однако другие авторы [138], получив 13 мутантов с заменами на С-концевом участке цитохрома Р 450d, выявили аминокислотные остатки на С-конце, важные для связывания апобелка.

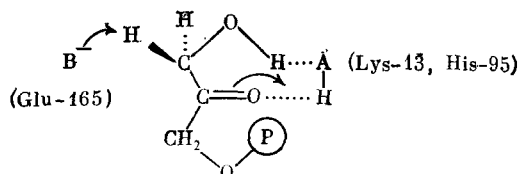
Для цитохром *c*-пероксидазы метод сайт-специфического мутагенеза помог выяснить роль Met-172 и Trp-51 в каталитической функции [139, 140]. При взаимодействии фермента с гидропероксидом образуется промежуточное соединение (I), которое содержит  $[\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}]$  и свободный радикал, расположенный на некоторой, пока неустановленной группе фермента. Предполагалось, что такой группой может являться либо индольное кольцо Trp-51, расположенное на 3,3 Å выше и почти параллельно плоскости гема, либо Met-172. Однако замена индольного кольца на гораздо труднее окисляемое кольцо фенилаланина не привела к потере активности. Мутация Met-172→Ser также не препятствовала образованию соединения (I). Таким образом, остатки Trp-51 и Met-172 не обязательны для образования соединения (I), и вопрос о локализации свободного радикала остается открытым.

*Сериновые протеазы (трипсин [141—143] и субтилизин [144—151])* явились хорошей моделью для конструирования белков генно-инженерными методами, так как имеется подробная информация об их структуре, кинетических и спектральных свойствах. Данные по структуре протеазы из одного источника можно использовать при изучении фермента из другого источника. Хотя, например, кристаллическая структура трипсина из печени крысы неизвестна, для экспериментов по сайт-специфическому мутагенезу использовали известную структуру бычьего трипсина, убедившись, что аминокислотный состав этих ферментов идентичен на 74%. При замене Gly-166 в субстратсвязывающей области фермента на отрицательно заряженные Asp и Glu увеличивалась каталитическая эффективность ( $k_{\text{кат}}/K_M$ ) для плохих субстратов нативного субтилизина и уменьшалась для хороших. Замена Gly-166 на неионные

остатки (Ala, Leu) увеличила каталитическую активность для субстратов, содержащих гидрофобные группы. Изменение специфичности связано в основном с изменением  $K_M$ , а не  $k_{\text{кат}}$  [144—147].

Анализ кристаллической структуры комплекса субтилизина с ингибиторами показал наличие водородной связи между амидной группой Asn-155 и кислородом тетраэдрического аниона. Точечные замены в положении 155, приводящие к изменению стерической конфигурации (Asn-155→Thr, Gln) или заряда (Asn-155→His, Asp) и донора водородной связи уменьшали  $k_{\text{кат}}$  в 200—4000 раз и  $K_M$  в 7 раз, что объясняется уменьшением энергии стабилизации переходного состояния на 9,2—20 кДж/моль [148, 149].

*Триозофосфатизомераза* [152—155]. В механизме катализа этого фермента принимает участие основная группа (карбоксилат-ион) Glu-165:



При замене Glu-165→Asp, т. е. удалении одной метиленовой группы, что приводит к сдвигу основной группы на 1 Å,  $k_{\text{кат}}$  уменьшилась в  $10^3$  раз (с 4300 до  $2,8 \text{ с}^{-1}$ ) при незначительном изменении  $K_M$ . Расчеты свободной энергии показали влияние мутации на свободную энергию переходного состояния на стадии енолизации.

*Аспартаттранскарбомилаза* [156—162] содержит 12 полипептидных цепей двух видов: шесть каталитических и шесть регуляторных. С помощью точечных замен в этих цепях, а также на участках между ними были выявлены участки фермента, ответственные за регуляторные свойства: петли, образованные остатками 230—245 каталитических цепей [157]; остаток Trp-209 на участке взаимодействия субъединиц [156, 158]. Замена Lys-83→Gln в каталитической цепи ведет к уменьшению кооперативности фермента, замена Gln-138→Ala — к ее повышению, т. е. эти аминокислотные остатки, по-видимому, определяют многие меж- и внутрицепочечные взаимодействия [159—162]. Кристаллографические исследования комплексов фермента с аналогами субстратов показали, что активный центр аспартаттранскарбомилазы состоит из нескольких участков, расположенных на разных каталитических субъединицах. Был предложен метод обнаружения каталитических сайтов для олигомерных ферментов — конструирование гибридов, содержащих мутантные мономеры, например гибрид из мономеров, содержащих мутации Lys-84→Glu, His-134→Ala, Ser-52→His, или гибриды из тримеров дикого типа и двойного мутанта Glu-84, Ala-134. Результаты мутации показали, что активные частицы образуются только после ассоциации цепей с образованием олигомера.

*Стафилококковая нуклеаза* [163—167]. Хотя рентгенографическая структура стафилококковой нуклеазы определена с высоким разрешением (1,5 Å), детальный механизм действия фермента не установлен. Для выяснения механизма связывания ионов  $\text{Ca}^{2+}$  была проведена мутация одного из остатков, окружающих  $\text{Ca}^{2+}$  в белке (Asp-40→Glu). Удаление одного из трех *цис*-лигандов уменьшило сродство к  $\text{Ca}^{2+}$  в 5 раз, а максимальную скорость — в 31 раз. Мутация не влияла на связывание ДНК, что согласуется с рентгенографической структурой, по данным которой Asp-40 взаимодействует с металлом, а не с цепью нуклеотидов [163, 164]. Замена различных остатков Tug в субстратсвязывающей полости фермента показала, что ОН-группа остатков Tug не играет значительной роли в катализе, но мутации ослабляли связывание с субстратом (одноцепочечной ДНК и РНК) [165]. Мутации

Glu-43 в активном центре вызывают конформационные изменения в белке, на расстоянии 15—30 Å от остатка 43 [166, 167].

$\alpha$ -Антитрипсин [168—171], ингибитор сериновых протеаз. Методом сайт-специфического мутагенеза было показано, что его инактивация связана с модификацией Met-358 под действием окислителей. Важную роль в функционировании ингибитора играют остатки Ile-356 и Pro-357. В активном центре Met-358 определяет специфичность связывания антитрипсина с белками. Нативный  $\alpha$ -антитрипсин с Met-358 узнает Pro-Met-последовательность эластазы. Мутанты Ala-358, Ile-358, Val-358 оказались эффективными ингибиторами нейтрофильных и панкреатических эластаз, но не катепсина G; мутанты Leu-358, Phe-358 предпочтительно ингибировали катепсин G.

Дрожжевая 3-фосфоглицераткиназа [172—174] состоит из двух глобулярных доменов, разделенных петлей полипептидной цепи. Было предположено, что в процессе катализа под действием субстрата происходит конформационное изменение, приводящее к «схлопыванию» доменов. На участке между доменами Glu-190 и His-388, возможно, взаимодействуют друг с другом (водородная связь или солевой мостик) и регулируют переход от закрытой формы фермента к открытой. Мутации Glu-190→Gln, Asp, His-388→Glu привели лишь к некоторому уменьшению каталитической активности и изменению  $K_m$  по обоим субстратам. Таким образом, результаты мутагенеза показали, что модель перехода от закрытой формы к открытой при катализе требует дальнейшего исследования [172, 173]. Интересным экспериментом явилось конструирование химерного белка, один из доменов которого выделен из человеческой 3-фосфоглицераткиназы, а другой — из дрожжевой. Гибрид сохранял свойства нативных белков [174].

Карбоксипептидазы [175—178]. Трехмерная структура карбоксипептидазы A известна уже около 20 лет, однако некоторые детали механизма действия остаются непонятными, например, роль Tyr-248, расположенного на расстоянии 3 Å от расщепляемой пептидной связи субстрата. Результаты сайт-специфического мутагенеза показали, что эта группа участвует не в гидролизе, а в связывании субстратов [175, 176]. В катализе принимает участие ОН-группа Tyr-198, стабилизируя комплекс в переходном состоянии [177]. Для дрожжевой карбоксипептидазы у замена Met-398→Leu привела к изменению специфичности фермента. Мутация увеличила гидрофобность субстратсвязывающего участка, поэтому мутант по сравнению с исходным ферментом обладал увеличенным сродством к субстратам с объемными и гидрофобными заместителями [178].

Другие ферменты. Метод сайт-специфического мутагенеза был также использован для изучения влияния структуры на активность дигидрофолатредуктазы *E. coli* (ДГФР) [179, 180]. Мутации Asp-27 в активном центре фермента показали, что он участвует в протонировании субстрата, но не в стабилизации переходного состояния, как предполагалось ранее. Протонирование дигидрофолата может происходить непосредственно группой аспарагина или с участием молекул воды. Для человеческой ДГФР показано, что Cys-6 участвует в связывании с NADPH и *n*-гидроксимеркуриобензоатом [181]. Для человеческого лизоцима [182, 183] получены мутанты с заменами аминокислот в активном центре. Их анализ показал, что Asp-53 участвует в электростатической стабилизации промежуточного состояния при гидролизе гликозидной связи. Существование ароматического остатка в положении 63 и Trp-64 необходимо для эффективного гидролиза хитиновых субстратов, но не для лизиса бактериальных субстратов. Подробно изучено влияние вставок и делеций на активность рибонуклеазы Р [184] и показано, что для нормального функционирования РНК-субъединицы рибонуклеазы Р *E. coli* необходим участок вторичной структуры, кодируемый нуклеотидами 275—295.

Для эндонуклеазы рестрикции (рестриктазы) EcoRI с помощью мутагенеза локализованы участки связывания фермента с ДНК. Перво-

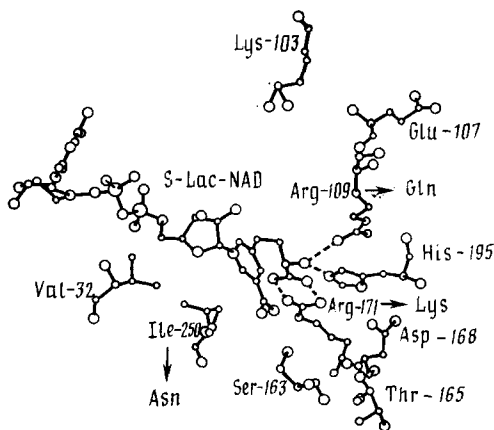


Рис. 7. Активный центр нативной лактатдегидрогеназы, связанной с субстратом [188]

начальная информация об этих участках была получена из рентгенографической структуры комплекса EcoRI с синтетическим олигонуклеотидом. Точечные мутанты (остатки Glu-111, Glu-144 и Arg-145) по специфичности почти не отличались от исходного фермента, но их удельная активность уменьшилась более, чем в 100 раз, в основном, за счет уменьшения *V* [185]. Анализ кристаллических структур, в частности, геометрии активных центров позволил с помощью мутаций изменить субстратную специфичность *аспартатаминотрансферазы* [186], *лактатдегидрогеназы* [187, 188] и *алкогольдегидрогеназы* [189] (см. гл. VI). Мутации Arg-109 в *лактатдегидрогеназе* из *B. stearothermophilus* — компонента подвижной полипептидной петли, экспонированной в раствор, показали, что он увеличивает поляризацию карбонильной группы пирувата и таким образом стабилизирует переходное состояние. Мутация Ile-250→Asn ухудшает каталитические свойства фермента (рис. 7). Замена каталитически важного Ser-102 в *щелочной фосфатазе* [190] на Cys привела к изменению лимитирующей стадии гидролиза эфиров: в отличие от нативной щелочной фосфатазы, кинетика действия мутанта с SH-группой вместо OH-группы зависит от уходящей группы эфира, при этом сохраняется высокое значение каталитической константы. Начаты работы по изучению *АТР-синтетазы* методом сайт-специфического мутагенеза [191]. На  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицах фермента найдены четыре остатка, способные к ионизации, существенные для проявления активности: Lys-175, Asp-261 на  $\alpha$ -субъединице, Lys-164 и Asp-252 — на  $\beta$ -субъединице фермента.

#### б) Сайт-специфический мутагенез ферментов с неизвестной кристаллической структурой

$\beta$ -Лактамаза [192—198] катализирует раскрытие  $\beta$ -лактамного цикла пенициллинов и цефалоспоринов, обеспечивая устойчивость клеток к антибиотикам. Класс А  $\beta$ -лактамаз содержит консервативную каталитическую триаду (Ser-70)—(Thr-71)—(…)—(Lys-73). Точечные замены Ser-70 позволили сделать вывод, что каталитически активны только те мутанты, которые в положении 70 содержат нуклеофильную группу, например Cys, хотя их активность значительно ниже активности нативной  $\beta$ -лактамазы [192—196]. Анализ 19 мутантов, содержащих все возможные варианты аминокислотных остатков в положении 71, показал, что Thr-71 не участвует в связывании субстратов и в осуществлении катализа, но важен для стабилизации белка, и некоторым образом влияет на специфичность катализа, определяя конфигурацию участка связывания  $\beta$ -лактамного кольца [197]. Мутация Lys-73→Arg привела к значительной потере активности. Обсуждается роль остатка Lys-73 в катализе: ориентация протона, уходящего от карбоксильной

группы Ser-70, наличие солевого мостика с Glu-166, участвующем в гидролизе ацилфермента [198].

**Рибулозодифосфаткарбоксилаза** [199—202]. Для фермента из *Rhodospirillum rubrum* были получены мутанты с заменами на участках связывания  $\text{CO}_2$ , ионов  $\text{Mg}^{2+}$  и рибулозодифосфата.  $\epsilon\text{-NH}_2$ -Группа Lys-201 участвует в образовании карбамат-иона при взаимодействии с  $\text{CO}_2$  и  $\text{Mg}^{2+}$ . Мутация Asp-198→Glu показала, что карбоксильная группа Asp-198 также играет роль в связывании двухвалентного металла [199]. Предполагалось, что две группы (Lys-166 и His-291) участвуют в процессе енолизации рибулозодифосфата, однако мутант с заменой His-291→Ala обладал высокой каталитической активностью. Таким образом, His-291 не играет центральной роли в катализе [200]. Замена Lys-166 на 7 различных остатков привела к значительной потере активности, однако механизм участия этой группы в катализе окончательно не выяснен. Отсутствие кристаллографических данных не позволяет ответить на вопрос об участии этой группы и в связывании субстратов [201]. Методом сайт-специфического мутагенеза фермента из *Anacystis nidulans* исследовали роль малой, некаталитической субъединицы S, точечные замены в которой влияли на каталитическую активность, но не на специфичность. Отсюда сделан вывод, что субъединица участвует в процессе активации субстратов, а не в регуляции [202].

**Лактозопермеаза** [203—212] — гидрофобный фермент, управляющий транспортом  $\beta$ -галактозида и протонов через мембрану. Для изучения роли SH-группы активного центра в катализе были получены мутанты Cys-148→Gly [203, 204] и Cys-148→Ser [205, 206]. Результаты показали, что Cys-148 важен для защиты фермента от инактивации (с помощью субстрата), но не обязателен для транспорта лактозы. Мутации других цистеиновых остатков показали, что из 8 остатков только Cys-154 необходим для проявления активности [207—209]. По предварительным данным, остаток гистидина также участвует в транспорте субстрата. Каждый из четырех гистидиновых остатков был заменен на Arg [210], Gln или Asp [211]. Оказалось, что His-322 включен в  $\text{H}^+$ -перенос через мембрану за счет протонирования имидазольного кольца. His-205 образует водородную связь либо с субстратом, либо внутри белка. Остатки Glu-325 и His-322 расположены на  $\alpha$ -спирали, пересекающей мембрану, образуют ионную пару и действуют как компоненты системы передачи заряда, поэтому важную роль играет полярность остатков и расстояние между имидазольной и карбоксильной группами. Мутации Glu-325→Ala, Val и двойная мутация Glu-325→His, His-322→Glu приводят к частичной или полной потере активности [212]. Предварительные эксперименты с другим мембранным ферментом — мелибиозопермеазой также показали наличие пары His/Glu, важной для катализа [212].

**Другие белки и ферменты.** Для биOLUMИнесцентного  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимого белка *акварина* [213] мутационные замены на трех участках связывания  $\text{Ca}^{2+}$  остатков Cys и His в предполагаемом активном центре показали, что связывание молекулярного кислорода происходит не только за счет SH-групп. Для проявления активности важна группа His-58, и, по крайней мере, две из четырех SH-групп. Для другого  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающего белка — *калмодулина* [214] с помощью мутагенеза изучали влияние структуры на взаимодействие с родственными белками — миозинкиназой, фосфодиэстеразой и NAD-киназой. Удаление анионного  $\alpha$ -спирального участка, который комплементарен положительно заряженной области связывающего белка, привело к изменению специфичности связывания.

Неожиданный результат получен при замене Thr-190 на Ile на участке, близком к активному центру *малатдегидрогеназы*: каталитическая активность возросла, в основном, за счет  $k_{\text{кат}}$ . Ранее предполагали, что остатки, окружающие Asp-152, His-180 и His-187 в активном центре, играют некоторую роль в связывании субстратов и кофакторов, но оказалось, что Thr-190 существенным образом влияет и на актив-

ность [215]. Сайт-мутагенез вирусной *нейроаминидазы* [216, 217] позволил предложить модель каталитического действия фермента, включающую Glu-276 как донор протонов. Для мутагенеза использовали, в основном, консервативные остатки (из 14 мутаций — 12 остатков, одинаковых для разных типов вирусов). Также получена серия мутантов *РНК-лигазы* фага T4 [218—220]. Отщепление 20% полипептидной цепи со стороны С-конца не влияет на РНК-лигазную активность. Мутации на участке связывания АТР показали, что Lys-99 участвует в образовании комплекса фермент-аденилат, а остатки 100—101 не влияют на эту реакцию. С целью выяснения структуры активного центра *тиопенициллинсвязывающего белка* 3 *E. coli* проводили замены Ser-307 и Ser-445. Оказалось, что Ser-445 не входит в активный центр, а Ser-307 ответственен за связывание пенициллина в составе пенициллинсвязывающей области Ser-X-X-Lys, обнаруженной в функционально близких белках [221]. Выявлена группа Glu-49, существенная для проявления активности  $\alpha$ -субъединицы *триптофансинтетазы* [222], SH-группа, существенная для проявления активности *антранилатсинтетазы* [223]. В случае *изопенициллин-N-синтетазы* показано, что группа Cys-106 участвует в связывании субстрата, но не обязательна для осуществления катализа [224]. В активном центре сериновой *гидроксиметилтрансферазы* [225] рядом с функционально важным Lys-229, обнаружен His-228, образующий для ферментов этого типа из разных источников водородную связь или солевой мостик с аминокислотой или пиридоксальфосфатом. Результаты мутационных замен в (или около) центре фосфорилирования *сАМР-зависимой протеинкиназы* показали, что фосфорилирование регуляторной субъединицы не играет существенной роли в регуляции активности [226], а в проявление положительной кооперативности между двумя центрами связывания сАМР этой субъединицы вносит значительный вклад остаток Thr-371 [227].

## V. УСТАНОВЛЕНИЕ ВЗАИМОСВЯЗИ МЕЖДУ СТРУКТУРОЙ И СТАБИЛЬНОСТЬЮ БЕЛКОВЫХ МАКРОМОЛЕКУЛ (МЕТОДАМИ ГЕННОЙ ИНЖЕНЕРИИ)

### 1. Факторы, определяющие структурную стабильность белка

Разность гиббсовской энергии нативного (Н) и денатурированного (Д) состояний кооперативного домена или однодоменного белка является мерой стабильности его структуры [11, 228].

Схема 3



$$\Delta G_{\text{ден}} = G_{\text{ден}} - G_{\text{нат.}}$$

Для большинства однодоменных белков зависимость  $\Delta G_{\text{ден}}$  от температуры описывается кривой (рис. 8), проходящей через максимум при температуре максимальной стабильности белка ( $T_{\text{макс}}$ ) и имеющей верхний ( $T_{\text{ден 1}} = T_{\text{пл}}$ ) и нижний ( $T_{\text{ден 2}}$ ) температурные пределы стабильности белка (при  $\Delta G_{\text{ден}} = 0$ ), т. е. на холоду белки инактивируются также, как и при повышенной температуре [229]. Величина  $T_{\text{макс}}$  для многих глобуляторных белков находится в интервале от  $-3$  до  $+15^\circ \text{C}$ , а их  $\Delta G_{\text{ден}}$  в области физиологических температур варьируются от 20 до 60 Дж/моль [230].

Стабильность белка характеризуют средней температурой перехода в денатурированное состояние,  $T_{\text{ден}}$  (или  $T_{\text{пл}}$ ), при которой денатурировано 50% белка и  $\Delta G_{\text{ден}} = 0$ , либо температурой максимальной стабильности белка,  $T_{\text{макс}}$ , при которой  $\Delta G_{\text{ден}}$  имеет максимальную величину (рис. 8), либо средней концентрацией денатурирующего агента и т. п. В случае необратимой денатурации кинетическую стабильность белков ( $\Delta G_{\text{ден}}^{\text{к}}$ ) чаще всего характеризуют константой скорости ( $k_{\text{дн}}$ ) изменения какого-либо свойства белка (КД- или УФ-спектров, флуоресценции, а для ферментов — их активности). Кинетические и термодинамические параметры денатурации белков часто изменяются па-

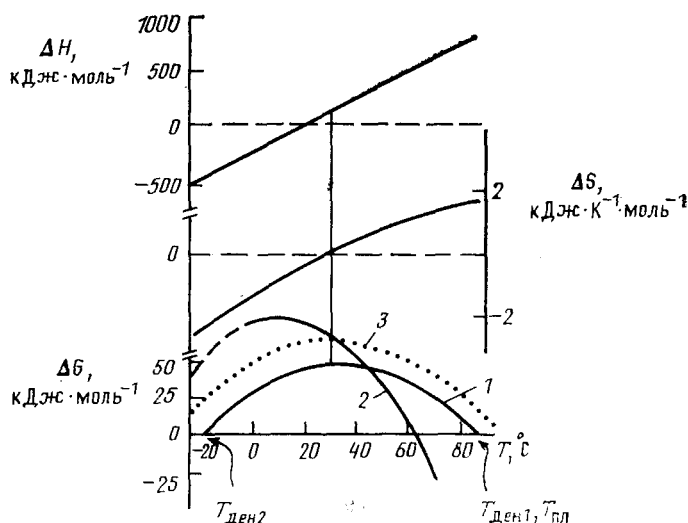


Рис. 8. Температурные зависимости энтальпии ( $\Delta H$ ), энтропии ( $\Delta S$ ) [11] и гиббсовской свободной энергии ( $\Delta G$ ) перехода белков из нативного в денатурированное состояние; 1 — миоглобин [11], 2 —  $\alpha$ -химотрипсин [229], 3 — гипотетическая кривая стабилизированного белка

параллельно при изменении условий денатурации, т. е. внутримолекулярные взаимодействия, которые обуславливают термодинамическую стабильность ( $\Delta G_{\text{ден}}$ ), по-видимому, определяют их кинетическую стабильность ( $\Delta G_{\text{ден}}^{\ddagger}$ ). В общем случае, термоденатурация описывается схемой:

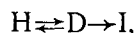


Схема 4

где I — необратимо денатурированный фермент. При  $K_{\text{ден}} \geq 1$ , чем более стабилен фермент против обратимой термоденатурации, тем более он стабилен и против необратимой, однако при  $K_{\text{ден}} \ll 1$  предполагается (без доказательств) отсутствие такой корреляции [231]. В общем случае сохранение активности ферментов может и не быть идентичным стабильности всей белковой глобулы [232]. Стабильность ферментов, как правило, определяется стабильностью доменов (или домена), образующих активный центр, и будет определяться стабильностью наиболее лабильного из доменов.

Факторы, определяющие стабильность нативной конформации белка, подробно рассмотрены в обзоре [232]. Главными из них являются следующие: 1) водородные связи; 2) увеличение конформационной энтропии при разворачивании структуры белка; 3) дальнедействующие электростатические взаимодействия. Если распределение заряда на поверхности макромолекулы ассиметрично по составу и геометрии, то поверхностный электростатический потенциал в отсутствие стерических препятствий будет создавать специфические ион-связывающие области, при насыщении которых соответствующими ионами стабильность белка увеличивается [233]; 4) гидрофобные взаимодействия неполярных аминокислотных остатков обусловлены в основном ван-дер-ваальсовскими взаимодействиями между молекулами. Вклад гидрофобных взаимодействий и водородных связей в стабильность структуры белка сопоставимы [228]; 5) внутримолекулярные солевые связи (энергия одной связи 1—3 ккал/моль), образующие либо единичные солевые мостики, либо кластеры; 6) внутримолекулярные шивки — S—S-связи (1,8 ккал/моль на одну связь); 7) комплексообразование белка с простетическими группами и ионами  $M^{n+}$ . Общая стабильность белковой молекулы определяется балансом между стабилизирующими и дестабилизирующими вкладами указанных выше взаимодействий. Определяющий вклад в



стабильность белка вносит эффективная концентрация взаимодействующих групп в свернутом и развернутом состояниях молекулы [234].

Термостабильность белка описывается сложной зависимостью  $\Delta G_{\text{ден}}$  от температуры (см. рис. 8) [11, 229]. Поэтому термостабильность различных ферментов необходимо изучать и сравнивать не при одной температуре, а в широком диапазоне температур (ср. [231] и [235]). Соотношение  $\Delta G_{\text{ден}}$  ферментов при фиксированной температуре не может быть экстраполировано на другие температуры. В случае изменения структуры одного белка, например, путем мутаций, найдена формула для расчета малых изменений  $\Delta G_{\text{ден}}$  по изменению  $T_{\text{ден}}$  [229].

## 2. Общие закономерности для направленного изменения стабильности белков и ферментов *in vitro* и *in vivo*

а) *Стабильность in vitro.* Для выяснения причин различной стабильности белков были сделаны первые попытки найти корреляцию между аминокислотным составом белков и их стабильностью ( $T_{\text{ден}}$ ) и сравнить первичные структуры белков с одинаковыми функциями и аминокислотными последовательностями, но обладающих различной стабильностью (выделенные из термофильных и мезофильных микроорганизмов). Подробно эти вопросы освещены в [236]. Предложены корреляции между  $T_{\text{ден}}$ , индексом гидрофобности остатков и их средним объемом [237], между  $T_{\text{ден}}$  и отношением площади поверхности белка, доступной растворителю в нативном и денатурированном состояниях [238], между  $T_{\text{ден}}$  и процентным содержанием в белке стабилизирующих и дестабилизирующих остатков [239], между  $T_{\text{ден}}$  и алифатическим индексом белка [240]. Недостатком этих корреляций является то, что: 1) они справедливы только внутри ограниченной группы белков определенного класса; 2) за меру стабильности принимали  $T_{\text{ден}}$ , которая, как уже отмечалось выше, не характеризует стабильность белка в целом. Вероятнее всего из-за большого многообразия факторов, ответственных за стабильность нативной конформации белка, вряд ли возможно существование простой корреляции, поэтому интерес к такого рода исследованиям уменьшается. При сравнении термофильных (*т*-) и мезофильных (*м*-) белков с известной первичной и трехмерной кристаллической структурой были выявлены структурные факторы, обуславливающие повышенную термостабильность *т*-ферментов [7, 236, 241, 242]: 1) термодинамически более выгодное расположение большего числа полярных и заряженных остатков на поверхности, а гидрофобных — внутри, характерное для *т*-ферментов [241]; 2) дополнительные одна-две солевые и водородные, а также гидрофобные связи в *т*-ферментах; 3) при переходе от *м*- к *т*-ферментам наиболее часто наблюдаются замены Ser→Gly, Thr, Ala; Gly→Ala; Lys→Arg, Ala; Val→Ala, Ile; Asp→Asn, Glu. Для *т*-ферментов характерно повышенное содержание Arg и пониженное Lys [243]; 4) *т*-ферменты имеют большее число S—S-связей,  $\alpha$ -спиралей,  $\beta$ -структуры [7].

Знание главных факторов, обеспечивающих стабильность нативной конформации белка в растворе, и особенностей структур *т*-белков позволяют сформулировать те общие принципы, использование которых дает возможность получать белки и ферменты с повышенной стабильностью: 1) введение дополнительных внутримолекулярных и межузельных связей (солевых, водородных), усиление гидрофобных взаимодействий увеличивает  $\Delta G_{\text{ден}}$  белка, как показано на рис. 8 (сдвиг кривой 1 вверх). Расчет показывает, что уменьшение  $k_{\text{ден}}$  в 10 раз при 70°С требует увеличения  $\Delta G_{\text{ден}}$  всего на 1,56 ккал/моль, а для увеличения  $T_{\text{ден}}$  от 35 до 45°С для полипептидной цепи с  $M=35$  кД требуется увеличение числа водородных связей лишь на 3% [244]. Поэтому даже одна дополнительная связь с энергией 1—3 ккал/моль, получаемая заменой 1—2 аминокислотных остатков, может существенно увеличить стабильность белка; 2) уменьшение конформационной подвижности фрагментов полипептидной цепи за счет образования дополнительных

внутримолекулярных ковалентных или нековалентных «сшивок» в глобуле; замены на остатки с меньшей конформационной гибкостью будут уменьшать конформационную энтропию ( $\Delta S_{\text{конф}}$ ) и тем самым увеличивать  $\Delta G_{\text{ден}}$  (и  $T_{\text{ден}}$ ).

Для практической реализации этих принципов на конкретном белке необходимо установить, в каком положении трехмерной структуры аминокислотные остатки подлежат замене (или модификации), какие именно аминокислотные остатки и на какие следует заменить, какие необходимо использовать методы, с помощью которых данные цели могут быть достигнуты.

До начала 80-х годов единственным методом направленного изменения структуры аминокислотных остатков была химическая модификация боковых функциональных групп белка. Однако этот метод имеет существенные недостатки и ограничения: модифицировать можно только остатки, имеющие функциональные группы и доступные растворителю в данных условиях, объем остатков после модификации увеличивается; невелик выбор модифицирующих агентов [245]. Сайт-специфический мутагенез позволяет заменить любой аминокислотный остаток в любом месте полипептидной цепи на любой другой и даже с меньшим объемом, причем может быть произведена замена только одного аминокислотного остатка.

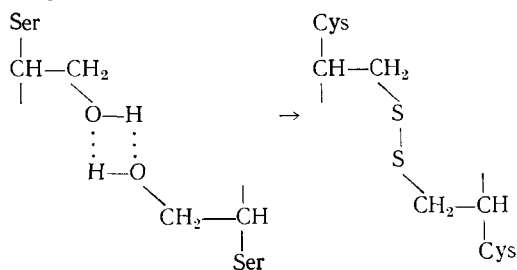
В работе [236] сформулированы общие закономерности изменения стабильности белков и ферментов в результате химической модификации. В свернутой белковой глобуле существуют три типа функциональных групп доступных для модификации. *Функциональные остатки I типа* расположены на поверхности глобулы. Это хорошо гидратированные, полярные или заряженные группы, которые в данных условиях не взаимодействуют друг с другом, а только с растворителем или ионами из раствора; их модификация не влияет на структуру и стабильность белка. *Функциональные остатки II типа* расположены на/или вблизи поверхности белка. В нативном ферменте они имеют неблагоприятное окружение (заряженные группы в гидрофобном окружении или в окружении одноименно заряженных групп) и дестабилизируют белковую глобулу. Число групп этого типа в белке обычно невелико. Модификация этих групп с изменением дестабилизирующего фактора увеличивает стабильность белка, в зависимости от степени модификации и природы модифицирующего агента. *Функциональные остатки III типа* удалены от поверхности глобулы и образуют внутримолекулярные солевые и водородные связи, стабилизирующие фермент. Эти группы недоступны для модификации в обычных условиях и модифицируются при разрыхленной конформации белка (при повышенной температуре, крайних значениях pH или в присутствии органических растворителей). Модификация групп III типа уменьшает термостабильность из-за разрушения внутримолекулярных связей, стабилизирующих его нативную конформацию. Структура фермента после такой модификации приближается к денатурированной.

Если известна трехмерная пространственная структура белка, то легко можно определить аминокислотные остатки, расположенные на поверхности молекулы (группы I типа) и внутри нее (группы III типа). Группы II типа можно идентифицировать при изучении ближайшего окружения данного аминокислотного остатка. Сравнение кристаллических структур белков различных классов: гомологических белков и их эволюционных предшественников, *t*- и *m*-белков, данные по влиянию сайт-специфического мутагенеза на стабильность ферментов позволяют утверждать, что закономерности по влиянию химической модификации различных функциональных групп белка на его стабильность в целом верны и для случаев изменения стабильности путем сайт-специфического мутагенеза. Аминокислотные замены в гомологичных белках встречаются наиболее часто на поверхности молекулы, так что ее конформация практически не изменяется. Более радикальные вставки и делеции имеют тенденцию встречаться в поверхностных петлях между единица-

ми вторичной структуры. Для белков с гомологией более 50% внутренняя часть их содержит более 90% общих аминокислотных остатков [101].

*Механизм и стратегия изменения стабильности белков и ферментов с помощью аминокислотных замен.* При выборе остатков в белке, подлежащих замене, необходимо учитывать следующее. 1) Замена остатков I типа на любые другие практически не будет изменять его стабильности, так как их среднее окружение в свернутом и развернутом состояниях мало различается. 2) Замена остатков II типа (неполярные остатки Leu, Ile, Val, Phe, Tyr, Trp, Met и Pro), находящихся в контакте с водой, остатков, находящихся в неблагоприятном электростатическом окружении, на малые полярные и заряженные остатки, может повысить стабильность белка [246]. Подтверждение этому факту найдено пока только в природе. Цитохром *c* из сердца быка стабильнее, чем белок из сердца лошади на 1,1 ккал/моль, что обусловлено, по мнению авторов, тем, что первый белок содержит Gly, а второй — экспонированный в воду Lys (энергия дестабилизации Lys при контакте с водой — 1,5 ккал/моль). В принципе установить наличие неблагоприятно сольватированных Lys, Tyr, Met, Trp можно путем химической модификации в неденатурирующих условиях. Замена экспонированных Lys на His (или на Arg, как в *t*-ферментах) будет в целом сохранять общий заряд молекулы, но уменьшать энергию дестабилизации белка [246]. 3) Внутренняя часть белков оптимально упакована, и все полярные атомы образуют водородные связи [247]. Произвольное изменение размера, формы или полярности внутренних остатков (остатки III типа) будет дестабилизировать молекулу. Эксперименты по изучению белков из температурно-чувствительных штаммов (и химической модификации) показали, что критичными для стабильности являются мутации во внутреннем ядре молекулы, а любые мутации на поверхности глобулы не изменяют стабильность белка. Однако можно увеличить термостабильность белка путем аккуратных замен этих остатков с целью образования дополнительных S—S-водородных и солевых связей, улучшения гидрофобной упаковки, как это и происходит в природе. Выбор аминокислотных остатков, подлежащих замене, производится с помощью компьютерного моделирования, так чтобы не изменялось пространственное расположение соседних остатков и не нарушались ближайшие внутримолекулярные взаимодействия [248].

Одним из энергетических подходов к стабилизации глобулярной структуры белка является уменьшение его *конформационной энтропии* ( $\Delta S_{\text{конф}}$ ) в развернутом состоянии. Это может быть достигнуто, например, образованием *внутримолекулярных дисульфидных связей* путем замены остатков III типа. Дисульфидные связи возникли в белках в ходе эволюции для увеличения их стабильности при функционировании в изменчивых внеклеточных условиях (внутриклеточные белки не имеют S—S-связей). S—S-Связи увеличивают термодинамическую стабильность белка и его устойчивость к необратимой термоинаktivации, уменьшая способность к агрегации или адсорбции, ограничивая экспонирование в раствор внутренних гидрофобных остатков [249]. Стратегия введения дополнительных S—S-связей в белках заключается в следующем. а) Выбираются остатки Ser или Thr, наиболее похожие на Cys. Например, пару Ser—Ser, образующую водородные связи можно заменить на Cys—Cys:



Если заменить пару Ser—Thr на Cys—Cys, то на месте метильной группы будет оставаться пустое пространство, что можно компенсировать заменой близлежащего Val на Leu или Ile [250]. б) Для белков с известной кристаллической структурой с помощью компьютерного анализа выбираются остатки, у которых атомы углерода находятся в той же геометрической позиции, что и у остатков, между которыми существует дисульфидная связь. Для введения дополнительной дисульфидной связи существуют стерические ограничения. Расстояние между углеродными атомами остатков, образующих S—S-связь, должно быть 4,5—6,5 Å, а углы, образованные S—S-связью, должны укладываться в установленные значения [251]. в) Энергия напряжения в S—S-связях нативных белков варьируется от 0,5 до 4,7 ккал/моль. Если сконструированная S—S-связь будет иметь энергию напряжения  $>4,7$  ккал/моль, то стабилизирующий эффект этой сшивки в белках будет нивелироваться [249]. Для этого гипотетические атомы S вводятся в моделируемую структуру, кандидаты с неподходящими стерическими взаимодействиями отбрасываются. Отобранные модельные структуры должны отвечать еще одному требованию. Цистеиновые мутации должны находиться в тех положениях, для которых наблюдаются некоторые изменения в ходе эволюции [252].

Уменьшение  $\Delta S_{\text{конф}}$  достигается также путем замены аминокислотных остатков, имеющих большую конформационную гибкость, например, Gly, на остатки, содержащие  $\beta$ -углеродный атом и потому имеющие меньшую гибкость (Ala, Pro) [250], так как

$$\Delta S_{\text{конф/остаток}} = R \ln Z,$$

где  $Z$  — число конформаций, доступных остатку в развернутом белке. Остатки для замены выбираются так, чтобы не возникали стерические затруднения после замены, и не изменялись функциональные свойства белка.

Вклад Ala в  $\Delta S_{\text{конф}}$  по сравнению с Gly составляет 2,4 э.е., а Pro относительно Ala — 4 э.е. Например, для лизоцима фага T4 замена Ala→Pro при pH 6,5 соответствует увеличению  $\Delta G_{\text{деп}}$  на 1,4 ккал и увеличению  $T_{\text{пл}}$  на 3,5°С.

Существует также несколько частных подходов к увеличению стабильности белков. Большая структурная стабильность  $\alpha$ -спирали в белках может быть достигнута при замене Val→Ala, а замена Ala→Val будет стабилизировать  $\beta$ -слоистую структуру белка. В целом необходимо для замен использовать не слишком гидрофобные и объемистые остатки, чтобы сохранить структуру [253]. Остаток Ala является интересным кандидатом для замещения других остатков в белках. С одной стороны, его введение часто увеличивает термостабильность белков (см. выше), повышенное содержание его характерно для  $t$ -ферментов. В то же время «антифризовые» белки (белки, предотвращающие замораживание клеток организмов, живущих при температуре ниже 0°С) содержат в своем составе до 60 мол.% Ala [254]. По-видимому, сайт-специфическое обогащение белков остатками Ala будет увеличивать их стабильность к денатурации холодом. Сайт-специфические замещения заряженных остатков на концах  $\alpha$ -спирали (изменение заряда на N-концевой части с +2 до —1, как в S-пептиде рибонуклеазы) могут повысить стабильность белка [255]. На примере тирозиназы предложены несколько другие подходы к стабилизации белков: 1) замены должны происходить в экспонированных остатках или в  $\beta$ -витках, а остатки в  $\alpha$ -спирали или  $\beta$ -слоях не должны изменяться; 2) не должна изменяться гидрофобность молекулы; 3) предпочтительны замены (из сравнения структур  $t$ - и  $m$ -ферментов) Asp→Glu, Lys→Gly, Val→Thr, Ser→Asn, Ile→Thr, Asn→Asp, Lys→Arg [256].

Стабильность белков по отношению к окислению и ионам тяжелых металлов можно увеличить путем замен: Cys→Ala или Ser; Met→Glu, Val, Ile, Leu; Trp→Phe или Tyr. Объем остатков после замен практически не изменяется и не возникает стерических затруднений, но замеща-

ются группы, чувствительные к окислению и комплексообразованию с ионами металлов [257]. Увеличения стабильности можно достичь, увеличивая количество металлсвязывающих участков в белках, введением дополнительных отрицательных зарядов [1].

В некоторых работах предполагается, что мутации, стабилизирующие белок, действуют аддитивно, т. е. стабильность белка можно существенно увеличить путем накопления большого числа стабилизирующих мутаций. Увеличения стабильности белка можно также добиться путем устранения (или насыщения) некоторых некомпенсированных групп, способных образовывать водородные связи, а также заполнением внутренних полостей в трехмерной структуре [258]. В то же время замещения многих остатков вряд ли будут действовать аддитивно [259].

Таким образом, хотя общая теория предсказания стабильности белка на основе его первичной структуры далека от завершения, с помощью графического моделирования при наличии трехмерной структуры можно выявить в белке остатки I, II и III типов, *a priori* выбрать подлежащие замене и замещающие аминокислотные остатки и получить ожидаемый результат.

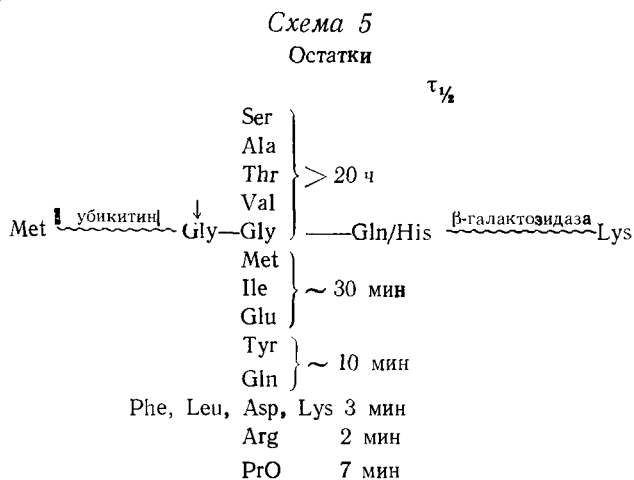
б) Стабильность белков *in vivo* в клетке определяется прежде всего их устойчивостью к внутриклеточному протеолизу. Дегградация внутримембранных белков и долгоживущих цитоплазматических белков происходит в лизосомах и цитозоле (наиболее селективная). Скорости оборота различных белков в клетке различаются в 1000 раз (от 2 мин до более 200 ч). Что же определяет время полужизни внутриклеточных белков ( $\tau_{1/2}$ )? Когда 35 белков с известной кристаллической структурой были введены в культуру HeLa клеток, то оказалось, что их  $\tau_{1/2}$  варьировались от 16 до 220 ч и не коррелировали с размером, зарядом, содержанием гидрофобных аминокислот, ацилированием N-концевой аминокислоты или соотношением между  $\alpha$ -спиралью и  $\beta$ -слоистой конформацией [260]. Калориметрические данные, доступные для 22 из этих белков, показали, что их термостабильность *in vitro* также не коррелируется с  $\tau_{1/2}$ . Предположение, что внутриклеточные протеазы «узнают» скорее внутреннюю часть белков, чем внешнюю (т. е. белки с большей подвижностью и гибкостью должны деградировать быстрее) также не подтвердилось, хотя известно, что белки с искаженной в результате мутаций конформацией быстро деградируют [261].

После денатурации белки становятся более доступны протеолизу *in vitro*. Однако сравнение  $\tau_{1/2}$  нативного и денатурированного бычьего сывороточного альбумина в цитозоле,  $\beta$ -лактоглобулина и цитохрома *c* в культуре клеток гепатомы крысы показало, что денатурированные белки иногда деградируют в несколько раз медленнее, чем нативные (или с такой же скоростью) [262].

Таким образом, ни одно из рассмотренных глобальных структурных свойств белковой макромолекулы не может служить критерием ее стабильности в клетке. Тем не менее, последние данные по белковым последовательностям свидетельствуют о существовании определенных сигналов в последовательности, ответственных за деструкцию молекулы. Так, белки с  $\tau_{1/2} < 2$  ч содержат одну или более областей, обогащенных Pro, Glu, Ser и Thr [263]. Эти области имеют от 12 до 60 остатков и защищены кластерами положительно заряженных аминокислот, что подтверждено для большого количества внутриклеточных белков. Существует еще один вид сигнала для повышенного протеолиза: S-пептид рибонуклеазы — 20 N-концевых аминокислот, в которых критическими являются (Lys-7)-Phe-Glu-Arg(Gln-11). S-Пептид, «пришитый» к лизоциму и инсулину, увеличивал в два раза скорость их дегградации в фибробластах [264].

В случае убикитин-зависимого нелизосомального селективного протеолиза принципиальную роль играет состояние  $\alpha$ -NH<sub>2</sub>-группы в белке. Критическим является убикитинизация N-конца белка. Было сформулировано «правило N-конца», устанавливающее зависимость стабиль-

ности белка *in vivo* ( $\tau_{1/2}$ ) от природы N-концевой аминокислоты [265]. С помощью сайт-специфического мутагенеза путем сшивки  $\beta$ -галактозидазы с убикитиновым белком были получены белки с различными аминокислотами на N-конце молекулы после удаления убикитинового белка (схема 5). В зависимости от аминокислоты  $\tau_{1/2}$  варьировалось следующим образом:



Если перед дестабилизирующими  $\beta$ -галактозидазу остатками в месте связывания с убикитином поставить Met, то  $\tau_{1/2}$  фермента увеличивается ( $>20$  ч). Авторы предполагают, что после того, как N-концевые пептидазы отщепляют N-конец синтезированной полипептидной цепи, «N-конецчитающие» ферменты узнают специфические остатки на N-конце, что и определяет их  $\tau_{1/2}$ . Долгоживущие белки в клетке действительно имеют на конце Met, Ser, Ala, Gly, Thr, Val. В то же время эукариотические токсины содержат на N-конце дестабилизирующие остатки Arg, Lys, Leu, Phe, Asp. Таким образом, установленное правило не только объясняет метаболическую стабильность белка, но и предлагает возможности для ее регуляции. Однако другие авторы [260] считают, что это правило — контрансляционное и выполняется для белков в еще не свернутом состоянии сразу после трансляции, так как  $\tau_{1/2}$  1—3 мин сравнимо со временем трансляции белка.

Окисление His, Cys и Met в белке, так же как деамидирование Asp, приводит к его быстрой деградации. По-видимому, окисленные белки узнаются специальными ферментами [266]. Стабильность внутриклеточных белков зависит также и от места их локализации. Более стабильны белки, входящие в мультиферментные комплексы и связанные с мембранными структурами.

Таким образом, стабильность белков *in vitro*, в растворе определяется специфическими внутримолекулярными взаимодействиями. Стабильность белков *in vivo* является более сложной величиной и зависит не только от структуры белка, но и от ее функции, от взаимодействия белка с другими белками и компонентами клетки. Для стабильности белка *in vivo* (в отличие от *in vitro*) принципиальное значение имеет не прочность внутренней структуры и способность к разворачиванию под действием различных факторов, а наличие определенных сигналов в аминокислотной последовательности, узнаваемых определенными протеиназами.

### 3. Изучение стабильности белков с помощью аминокислотных замен

Первые работы по влиянию случайных аминокислотных замен на стабильность белков появились в конце 70-х годов на примере лизоцима фага T4 и  $\alpha$ -субъединицы триптофансинтетазы (обзор первых работ см. в [236]). Белки выделяли из мутантных штаммов, полученных различными способами, поэтому и влияние случайных аминокислотных

замен на стабильность белков было непредсказуемым. С развитием кристаллографической техники и методов геной инженерии оказалось возможным целенаправленно производить замены с предсказанием определенного результата. Ниже даны примеры изучения стабильности разных белков с помощью мутаций (случайных и направленных), во многом подтверждающие и иллюстрирующие описанные выше закономерности.

Наличие остатков I, II и III типов в белках наглядно доказывается при изучении лизоцима из температурно-чувствительных штаммов фага T4, удобного модельного мономерного белка, не имеющего S—S-связей и простетических групп. При сравнении кристаллических структур мутантных лизоцимов оказалось, что большинство мутаций, дестабилизирующих лизоцим, встречаются среди остатков, которые недоступны растворителю, имеют жесткую конформацию и наиболее неподвижны в молекуле. Эти аминокислотные остатки, находясь в «твердой» части молекулы образуют стабилизирующие внутримолекулярные связи (остатки III типа). Мутанты лизоцима, в которых внутренний остаток Thr-157, образующий водородные связи, был заменен на Ile, Ala, Ser, Leu, Asp и др. остатки, имели  $T_{ден} < T_{ден}$  нативного лизоцима на 9—13°С (рН 2,0). Причиной этого является разрушенная и не скомпенсированная водородная связь [267—269].

Температурно-чувствительные мутации практически не встречаются среди экспонированных в растворитель и подвижных аминокислотных остатков. Например, замена Cys-54, Glu-128, Pro-86, на любые другие остатки не влияет на стабильность лизоцима [270]. Аналогичные результаты получены для стафилококковой нуклеазы [271] и канамидин-нуклеотидилтрансферазы [272]. Для последнего фермента получены 6 мутантов с одним аминокислотным замещением в С-концевой области методом сегмент-направленного мутагенеза. Стабильность всех мутантов Gly-242→Arg, Gly-242→Glu, Gly-204→Asp, Phe-230→Ser, Pro-252→Leu (кроме одного Glu-210→His), уменьшается в указанном порядке и меньше, чем стабильность нативного фермента. По мнению авторов, это объясняется заменами среди остатков, погруженных в гидрофобное ядро молекулы, и зависит от природы замещенного остатка [272]. Для белка репрессора фага  $\lambda$ , который состоит из N-концевого ДНК-связывающего домена (92 остатка) и С-концевого домена (144 остатка), были получены 11 одноточечных мутантов в области N-концевого домена. Анализ КД-спектров показал, что мутации аминокислотных остатков, экспонированных в растворитель, не изменяют стабильность  $\lambda$ -репрессора, а мутации внутренних аминокислотных остатков уменьшают ее. Только одна поверхностная мутация Gln-33→Tyr увеличивает термостабильность  $\lambda$ -репрессора (остаток II типа). Предполагается, что введенный Tyr-33 взаимодействует с Tyr-22 на расстоянии 25 Å, что обуславливает стабилизацию структуры [273].

Интересен редкий доказанный пример мутаций остатков II типа. Все мутации в субтилизине (Met-50→Phe/Ile-107→Val/Lys-113→Arg), увеличивающие его стабильность в области щелочных рН, локализованы вблизи поверхности молекулы, что было показано на трехмерной структуре белка. Моделирование замещений Met-50 показало, что введение Phe делает гидрофобное взаимодействие с Trp-113 более благоприятным, что и было обнаружено в кристаллической структуре белка [274].

*Примеры по введению дополнительных S—S-связей.* Недавно получен патент на получение стабильных белков с дополнительными S—S-связями [275]. Для этого в компьютер вводятся рентгенографические данные для конкретного белка и находятся места для введения остатков Cys с учетом указанных выше необходимых условий [39]. Ген, кодирующий данный белок, с нуклеотидными заменами, дающими Cys, модифицируют методом сайт-специфического мутагенеза, встраивают в плазмиду и экспрессируют в нужной культуре.

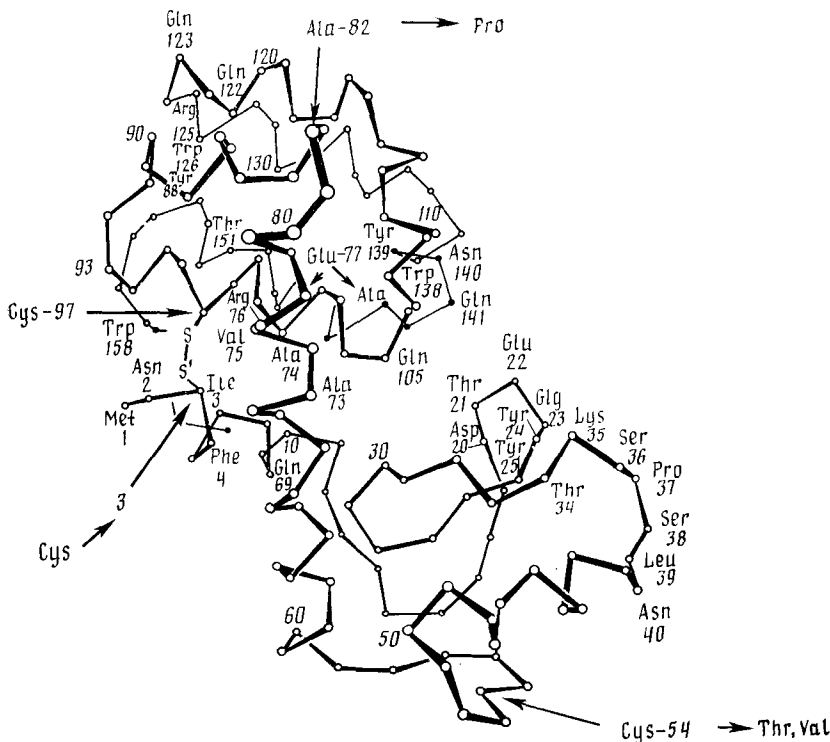


Рис. 9. Пространственная структура лизоцима фага Т4 [277]

Таким путем был получен стабильный мутант лизоцима фага Т4. Нативный фермент имеет 2 остатка Cys-54 и 97, но не содержит S—S-связей. Из анализа рентгенографической структуры лизоцима для образования дисульфидной связи были выбраны положения 3 и 97 и сконструирован мутант Ile-3→Cys (сохраняется 77% активности) (рис. 9). Окисление лизоцима *in vitro* приводит к образованию S—S-связи (Cys-3)—(Cys-97). Стабильность при этом увеличивается примерно в 30 раз (67°С). Термоинактивация в присутствии дитиотреитола (ДТТ) показала, что стабилизация обусловлена именно образованием S—S-связи, а не замещением Ile→Cys. В то же время Cys-54 при повышенной температуре включается в тиолдисульфидный обмен, приводящий к инактивации лизоцима путем образования межмолекулярных S—S-связей. Поэтому были получены мутанты, где Cys-54 замещен на другие остатки с сохранением S—S-связи в положениях 3—97, что увеличило стабильность еще в несколько раз (замены только Cys-54 на Thr и Val не изменяют стабильности лизоцима) [276]. Для детального исследования роли Cys-54 и 97 в окислительной инактивации лизоцима фага Т4 был сконструирован двойной мутант Cys-54/Cys-97→Val/Ser. Его стабильность оказалась выше, чем нативного лизоцима. Использование таких мутаций позволило раскрыть механизм термоинактивации лизоцима. Обратимое разворачивание молекулы при повышенных температурах осложняется вторичными процессами, главным из которых является окислительная инактивация с образованием S—S-связанных олигомеров (что было показано электрофоретически). Удаление Cys из лизоцима предотвращает окислительную инактивацию. Этот мутант претерпевает при нагревании обратимое разворачивание с регенерацией активности после обработки гуанидингидрохлоридом (Gu·HCl). В то же время мутант с S—S-связью (3—97), в котором Cys-54→Val, хотя и обладает большей стабильностью, но процент регенерации активности после разворачивания в Gu·HCl и сворачивания близок к нулю. Вероятно, что другие белки, содержащие свободные Cys, также



подвергаются термоокислительной инактивации и поэтому могут быть стабилизированы аналогичными аминокислотными заменами [277].

Дигидрофолатредуктаза (ДФР) содержит одну полипептидную цепь (159 остатков). Остаток Pro-39 расположен напротив Cys-85. Расстояние между  $\alpha$ -углеродными атомами — 6 Å, такое же как в S—S-связи, и оба остатка находятся далеко от активного центра, поэтому мутация Pro-39→Cys, не изменяя активности фермента, приводит после окисления динитробензоатом к образованию S—S-связи (39—85) [278]. Полученный мутант ДФР более стабилен по отношению к денатурации мочевиной и Gu·HCl на 1,8 ккал/моль и имеет измененный механизм сворачивания — разворачивания [279]. Сравнение кристаллических структур мутанта и нативного фермента показало их идентичность. Однако термостабильность мутанта примерно такая же, как и нативной ДФР ( $T_{пл}$  44 и 41°С соответственно).

Для белка репрессора фага  $\lambda$  компьютерный анализ [280] показал целесообразность введения S—S-связи между субъединицами репрессора (Cys-88) — (Cys-88'), если заменить Thr-88 на Cys [281].

Для мутанта Thr-88→Cys, S—S-связь образовывалась спонтанно; мутант был более стабилен к денатурации мочевиной, чем нативный белок, а  $T_{пл}$  увеличилась с 49 до 56—60°С. В то же время мутант Thr-85→Cys не образует ковалентно связанного димера. Структура цепи в нем нарушена, поэтому и стабильность ниже, чем у нативного  $\lambda$ -репрессора [280].

Для субтилизина из *B. amyloliquefaciens*, не содержащего S—S-связей, для введения S—S-связи были выбраны положения Thr-22 и Ser-87. Методом сайт-специфического мутагенеза в эти положения вводили Cys, которые самопроизвольно образовывали S—S-связь (либо в процессе синтеза белка, либо его секреции). Эти мутации не влияли на каталитические свойства субтилизина, а  $T_{пл}$  увеличилась с 58,9 до 62°С. В присутствии же ДТТ, когда S—S-связь разрушается,  $T_{пл}$  = 56,2°С. Скорость термоинактивации мутанта Cys-22→Cys-87 в 1,5—2 раза меньше,  $\tau_{1/2}$  в 8 М мочевины — в 2 раза выше [252].

**Стабилизация белков заменой остатков, имеющих большую гибкость** (Gly) в развернутом состоянии белка на остатки с ограниченной конформационной свободой (Ala, Thr, Val, Ile, Pro). Для лизоцима фага T4 путем компьютерного моделирования были выбраны такие места замен, чтобы ни третичная структура белка, ни взаимодействия с соседними остатками не изменялись. Кандидатами для замены на Ala были выбраны Gly-77 и Gly-113, для замены на Pro—Ala-82. Сравнение кристаллических структур нативного и мутантных Gly-77→Ala и Ala-82→Pro лизоцимов показало, что они практически идентичны, за исключением того, что карбоксильный углерод Glu-108, ближайшего к Ala-77, сдвинут на 1,3 Å, но тем не менее водородные связи между остатками не нарушаются. В мутанте Ala-82→Pro происходит смещение молекулы H<sub>2</sub>O, связанной с пептидным азотом Ala-82 в нативном белке. Однако эти изменения минорны и не оказывают влияния на стабильность лизоцима. Для мутантов Ala-77 и Pro-82  $T_{пл}$  при pH 6,5 увеличиваются с 64,7 до 65,6 и 66,8°С соответственно, а энергия стабилизации составляет 0,4 и 0,8 ккал/моль, соответственно, за счет уменьшения энтропии разворачивания белка [258]. Аналогично, замещения Gly→Ala увеличивали стабильность  $\lambda$ -репрессора [282] и нейтральной протеазы из *B. stearothermophilus* при замене Gly-144→Ala [283]. Эта замена была выявлена при сравнении т- и м-ферментов. Правда, в этих случаях повышение стабильности объясняли заменой в  $\alpha$ -спирали слабо спиралеобразующего остатка Gly на хорошо спиралеобразующий остаток Ala.

Линейная корреляция между гидрофобностью замещенных остатков и увеличением  $\Delta G_{ден}$  после точечных мутаций была показана для  $\alpha$ -субъединицы триптофансинтетазы [273, 284]. Эта корреляция может объясняться тем, что диэлектрическая постоянная внутри белка уменьшается с увеличением гидрофобности внутренних аминокислотных остатков, что приводит к усилению гидрофобных и электростатических

взаимодействий. Для  $\alpha$ -субъединицы триптофансинтетазы точечные мутанты, выделенные из мутантных штаммов, имеют в 2 раза большую стабильность, чем нативная при заменах Glu-49→Met, Gly-211→Glu, Gly-234→Asp, и меньшую при заменах: Phe-22→Leu, Glu-49→Gln, Leu-177→Arg, Gly-211→Arg, Gly-213→Val. Однако в этих случаях не сравнивали третичные структуры мутантов, что делает результаты не совсем однозначными.

Отдельные независимые мутации могут действовать на стабильность белка аддитивно, и накопление нескольких таких мутаций с энергией стабилизации 1 ккал/моль дает радикальное увеличение  $\Delta G_{\text{ден}}$ . Например, для канамициннуклеотидилтрансферазы мутанты с заменами: Asp-80→Tyr, Thr-130→Lys и двойной мутант Tyr-80/Lys-130 имели максимум активности при 56, 60 и 62° соответственно, а нативный — 52° С. Стабильность к протеолизу у двойного мутанта выше, чем у точечных и у нативного фермента [285]. Причинами стабилизации являются дополнительные водородные связи и электростатические взаимодействия.

Одна из причин нестабильности белков — их окисление с последующей инактивацией и денатурацией. Это особенно относится к белкам, содержащим Met, Cys или Trp вблизи активного центра. В субтилизине Met-50 и Met-222 находятся на поверхности молекулы, причем Met-222 — вблизи Ser-221 активного центра. При замене Met-222 на Cys мутант имел 138% активности, а Ala — 53% активности и на Ser — 35% активности. Все другие замены приводили к большому падению активности субтилизина. Нативный субтилизин в 0,1 М  $\text{H}_2\text{O}_2$  имеет  $\tau_{1/2}$  = 2,5 мин. Мутанты Met-222→Ser, Ala или Leu стабильны в этих условиях более 1 ч, а Cys-мутант вообще не окисляется 0,1 М  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Таким образом, замена Met-222 на остатки, устойчивые к окислению, увеличивает стабильность субтилизина [286].

Стабильность белков можно увеличить путем уменьшения площади поверхности гидрофобной части, контактирующей с растворителем, как было показано для лактатдегидрогеназы из *B. steurotherm*. Гидрофобный Ile-250, лежащий на поверхности NAD-связывающего кармана, заменили на гидрофильный Asn. При этом  $k_{\text{ин}}$  мутанта уменьшилась в 4,5 раза (90° С), может быть, и за счет образования дополнительной водородной связи (Thr-246) — (Asn-250) [287].

Выше были рассмотрены примеры, подтверждающие общие закономерности изменения стабильности белковых молекул, а также примеры, где опираясь на эти закономерности, достигнуты желаемые результаты по стабилизации белков. Однако во многих работах влияние аминокислотных замен на стабильность индивидуально для каждого белка. Как правило, это относится к белкам с неизвестной трехмерной структурой, для которых невозможно компьютерное моделирование замен и надежный прогноз эффекта.

В мономерной форме *изо-1-цитохрома с* (остаток Cys-102 блокирован) Pro-71 — эволюционно консервативный остаток, важный для сворачивания и разделяющий две короткие  $\alpha$ -спиральные области, определяя конец одной и начало другой спирали. Замены его на Val, Thr, Ile не меняют функциональных свойств и структуры, но изменяют стабильность белка. Так стабильность по отношению к гуанидингидрохлориду ( $\Delta G_{\text{ден}}$  ккал/моль) мутантов уменьшается в ряду: нативный; Val-71; Thr-71; Ile-71; 3,6; 2,6; 1,9; и 1,9 соответственно [288]. Исследование кинетики денатурации показало, что локализация мутации в первичной структуре определяет, скорость какой стадии будет меняться, а природа заместителя влияет на величину изменения скорости этой стадии [289].

Мутант Pro-87→Ser *аденилаткиназы* из температурночувствительного штамма *E. coli* имел  $k_{\text{нат}}/K_M$  в 17 раз меньше (при 27° С), чем нативный и меньшую термостабильность. В мутантной аденилаткиназе содержание  $\alpha$ -спирали уменьшилось на 11%. Анализ КД-спектров показал, что мутация приводит к уширению структуры фермента. В ре-

зультате увеличилась чувствительность мутанта к протеолизу. Предполагается, что Pro-87 расположен внутри глобулы в области интенсивно взаимодействующих Asp-84, Phe-86, Arg-88, и его замена на более гибкий и полярный Ser, разрушает эти взаимодействия, дестабилизируя структуру аденилаткиназы [290]. Одноточечные замены в  $\alpha$ -субъединице *триптофансинтетазы* [291, 292] и в дигидрофолатредуктазе [293] позволили выявить роль отдельных аминокислотных остатков на каждой стадии обратимой денатурации этих ферментов в мочевице.

Все рассмотренные выше работы были посвящены стабилизации ферментов по отношению к обратимой денатурации. Причина перехода белковой молекулы в необратимо развернутое состояние заключается в агрегации молекул белка, в химической модификации функциональных групп, более доступных растворителю в денатурированном состоянии, в результате чего молекула не может свернуться в нативную конформацию.

На примере *триозофосфатизомеразы* (ТФИ) — фермента, состоящего из двух идентичных субъединиц, без S—S-связей и небелковых компонентов, с помощью сайт-специфического мутагенеза была сделана попытка предотвратить процесс необратимой денатурации. Как было установлено из анализа кристаллической структуры, остатки Asn, расположенные на поверхности молекулы между субъединицами, в процессе термоинактивации деаминируются с образованием заряженных Asp, что приводит к диссоциации димера на неактивные мономеры. Были получены мутанты Asn-78→Thr, Ile и Asn-14/Asn-78→Thr/Ile. Время их полужизни при 100°С увеличилось с 13 до 17, 16 и 25 мин соответственно, в то же время они имели меньшую  $T_{пл}$  (на 2—3°С), чем нативная ТФИ, т. е. эти мутации дестабилизируют фермент против обратимой термоинактивации [294, 295]. Этот подход авторов представляется не совсем корректным, поскольку процесс необратимой термоинактивации белков связан не только и не столько с химической модификацией функциональных групп, но и с физическими процессами агрегации денатурированных молекул после разворачивания. Более перспективной представляется стабилизация нативной конформации белка, используя стратегию, описанную выше.

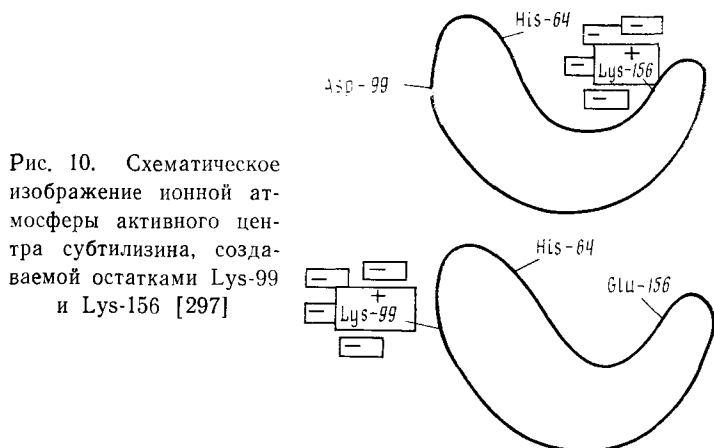
## VI. БЕЛКОВЫЙ ДИЗАЙН

Высшей ступенью развития генной инженерии белковых молекул является конструирование белков с заданными свойствами, структурой и стабильностью, т. е. белковый дизайн. Для направленного изменения каталитических свойств, субстратной специфичности необходимо детальное изучение механизма ферментативной реакции, структуры субстратсвязывающего участка и активного центра, для изменения стабильности к действию температуры или химических реагентов — факторов, определяющих стабильность белка, а также расположение групп, функционально важных для катализа, чтобы изменения структуры в целях повышения стабильности не привели к потере каталитической функции. Белковый дизайн становится возможным, если получена рентгенографическая структура белка с высоким разрешением, которая служит основой для компьютерного анализа и графики.

Например, анализ пространственного расположения группы Met-222 в субтилизине показал, что ее замена на остатки с малыми боковыми цепями (Glu, Ala, Ser, Cys и др.) не изменит конформации каталитической области и сохранит высокую активность, а замена на остатки с длинными боковыми цепями приведет к снижению активности фермента. Результаты мутагенеза подтвердили правильность модели, а один из мутантов с заменой Met-222→Cys обладал активностью более высокой, чем нативный субтилизин [296].

Учет электростатических эффектов в активном центре субтилизина привел к получению мутантов с измененным рН-профилем активности. Сформулированы правила для конструирования белков с измененной

pH-зависимостью [297]: 1) увеличение отрицательного заряда в области активного центра увеличивает  $pK_a$  кислых групп, увеличение положительного заряда — понижает  $pK_a$ ; 2) изменение pH-зависимости проявляется при низкой ионной силе; 3) мутации следует проводить таким образом, чтобы в области активного центра не происходило концентрирования противоионов. Замена поверхностного заряда в активном центре субтилизина (Asp-99→Ser) (рис. 10) привела к значительному сдвигу pH-профиля активности в кислую область [150, 151, 297].



Направленное изменение субстратной специфичности ферментов достигается за счет изменения конформации субстратсвязывающей области. Замена Gly-216→Ala в трипсине увеличила каталитическую активность по отношению к аргининовым субстратам, а замена Gly-226→Ala — к лизиновым [141]. В случае лактатдегидрогеназы активный центр был реконструирован следующим образом: Thr-246→Gly (увеличение объема активного центра), Asp-197→Asn (нейтрализация кислоты), Glu-102→Arg (введение основания для обеспечения связывания карбоксилата). Тройной мутант окислял малат в 23 раза эффективнее, чем лактат, и восстанавливал оксалоацетат в 500 раз эффективнее, чем пируват, в то время как нативный фермент имел в 1000 раз большую каталитическую активность к пирувату по сравнению с оксалоацетатом. Таким образом, мутантный фермент приобрел свойства малатдегидрогеназы [179].

У алкогольдегидрогеназы длинные боковые цепи остатков Trp-93 и Thr-48 уменьшают размер субстратсвязывающего кармана, поэтому фермент с наибольшей эффективностью катализирует окисление спиртов с короткой боковой цепью (этанол, *n*-пропанол). Замена этих остатков на остатки меньшего размера Trp-93→Phe и Thr-48→Ser увеличила эффективность окисления длинноцепочечных спиртов (*n*-октанол, *n*-гептанол) по сравнению с этанолом [182].

Интересным примером получения белка с новыми, улучшенными свойствами является сайт-специфический мутагенез лигандов гема в цитохроме  $b_5$  [298].

Замена аксиального лиганда гема His-39→Met значительно снизила окислительно-восстановительный потенциал. Пероксидазная активность в реакции с *o*-дианизидином белка-мутанта возросла в 30 раз. Кроме того, мутант приобрел новое свойство — катализировал межмолекулярное окислительное деметилирование *N,N*-диметиланилина  $H_2O_2$ . Нативный цитохром  $b_5$  полностью неактивен в этой реакции.

В пенициллинсвязывающем белке 5 из *E. coli* проведена замена С-концевого гидрофобного сегмента, связывающего этот белок с мембраной, на более короткий, содержащий гидрофильные аминокислоты. Она привела к получению водорастворимого белка с полным сохранением его активности [299].

Блестящим примером белкового дизайна является *конструирование белков* со значительно *большей стабильностью* при использовании общих подходов и закономерностей, рассмотренных в гл. 5. Введение внутримолекулярных дисульфидных связей привело к стабилизации лизоцима фага Т4 [276], субтилизина [252], N-концевого домена  $\lambda$ -репрессора [280], дигидрофолатредуктазы [180]. Замена в субтилизине Met-222 на остатки, устойчивые к окислению (Ser, Ala), значительно увеличила стабильность этого фермента [286]. Замены неразветвленных остатков на остатки с разветвленными  $\beta$ -углеродными цепями (Thr, Val, Ile) ограничивали конформацию белка, и поэтому значительно увеличили стабильность Т4 лизоцима [258].

Наконец интересными работами по белковому дизайну являются работы по *созданию белков-гибридов*, обладающих совокупностью свойств составляющих их белков. Так, сконструирован белок *E. coli*, обладающий аденилатциклазной и  $\beta$ -галактозидазной активностью [300]. Он состоит из первых 556 (из 848) аминокислотных остатков аденилатциклазы (фермента, ответственного за синтез cAMP), связанных через синтетический пентапептид Val-Gly-Asp-Pro-Val, с восьмым остатком  $\beta$ -галактозидазы ( $M=175$  кД). Полученный химерный белок — тетрамер. рН-оптимум аденилатциклазной активности в гибридном белке сдвинут в щелочную область (с 8,5 до 9,5), и избыток АТФ не ингибирует аденилатциклазную активность гибрида в отличие от нативного фермента, что объясняется, по-видимому, отсутствием в гибриде регуляторного домена. Кинетические свойства гибридного белка близки к свойствам обоих составляющих белков, однако он менее стабилен, чем  $\beta$ -галактозидаза. Генно-инженерным методом получен также гибрид человеческого гормона роста и сигнального пептида внешней мембранного белка *E. coli* OmpA. Рекомбинантная ДНК экспрессировалась в клетках *E. coli*, и синтезированный гормон роста секретиrowался в периплазму *E. coli*, причем он обладал правильной вторичной структурой и образовывал нужные S—S-связи. Таким образом, присоединение сигнального пептида обеспечило прохождение гибридного белка через клеточную мембрану *E. coli* и правильное сворачивание синтезированного белка с образованием нужных дисульфидных связей [301].

\* \* \*

Изложенный анализ литературы показывает, что техника белковой инженерии является революционным экспериментальным инструментом для решения фундаментальных задач современной энзимологии: установления взаимосвязи структура — функция — стабильность белковых макромолекул. Изучение многочисленных мутантных белков с помощью компьютерной графики дает алгоритм для получения ферментов с заранее заданными свойствами с целью их использования в биотехнологии. Потребность использования методов генной инженерии в современной белковой химии не только очевидна, она действительно необходима для решения как научных, так и прикладных задач.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Bryan P. N.//Biotechnol. Adv. 1987. V. 5. P. 221.
2. Уайт А., Хендлер Ф., Смит Э. и др.//Основы биохимии. М.: Мир, 1981. Т. 2. Гл. 25, 26.
3. Уотсон Д., Туз Д., Курц Д. Рекомбинантные ДНК. М.: Мир, 1986.
4. Heijne G., Blomberg C., Liljenström H.//J. Theor. Biol. 1987. V. 125. P. 1.
5. Ghelis C., Yons J.//Protein Folding. N. Y.: Acad. Press, 1983.
6. McLaman M. T., Andrews W. H., Files J. G.//J. Biotechnol. 1985. V. 2. P. 117.
7. Кутuzова Г. Д., Угарова Н. Н., Березин И. В.//Биоорган. химия. 1982. Т. 8. С. 1445.
8. Дулиттл Р. Ф.//В мире науки. 1985. № 12. С. 40.
9. Rose G. D., Geselonitz A. R., Lesser G. J. et al.//Science. 1986. V. 229. P. 834.
10. Yaenicke R.//Prog. Biophys. Molec. Biol. 1987. V. 49. P. 117.
11. Привалов П. Л.//Вест. АН СССР. 1986. № 2. С. 72.
12. Привалов П. Л.//Биофизика. 1985. Т. 30. С. 722.
13. Traut Th. W.//Mol. Cell. Biochem. 1986. V. 70. P. 3.
14. Wetlaufer D. B.//Adv. Prot. Chem. 1981. V. 34. P. 61.

15. Ollis D., Brick P., Hamlin R. et al.//Nature. 1985. V. 313. P. 762.
16. Kiehn E. D., Holland J. J.//Ibid. 1970. V. 226. P. 544.
17. Querol E., Parrilla A.//Experimentia. 1987. V. 43. P. 920.
18. Creighton T. E., Goldenberg D. P.//J. Mol. Biol. 1984. V. 179. P. 497.
19. Protzel A., Morris A. J.//J. Biol. Chem. 1974. V. 249. P. 4594.
20. Randell L. L., Josefsson L. G., Hardy S. J.//Eur. J. Biochem. 1980. V. 107. P. 375.
21. Purvis I. J., Bettany A. J. E., Santiago T. Ch. et al.//J. Mol. Biol. 1987. V. 193. P. 413.
22. Burke R. L., Tekamp-Olson P., Najarian R.//J. Biol. Chem. 1983. V. 258. P. 2193.
23. Coggins J. R., Hardie D. G.//Multidomain Proteins. Amsterdam: Elsevier, 1986. P. 1.
24. Matthews C. R., Hurlle M. K.//Bio Essay. 1987. V. 6. P. 254.
25. Matthews C. R.//Methods Enzymol. 1987. V. 154. P. 498.
26. Sugihara J., Baldwin T. O.//Biochemistry. 1988. V. 27. P. 2872.
27. Imoto T., Yamada H., Yasukochi T. et al.//Prot. Eng. 1987. V. 1. P. 333.
28. Marks C. B., Naderi H., Kosen Ph. A. et al.//Science. 1987. V. 235. P. 1370.
29. Brändeu C.-I.//Chemica Scripta. 1986. V. 26B. P. 247.
30. Rossman M. G.//Phil. Trans. Soc. London. 1981. V. 293. P. 191.
31. Rao S. T., Rossman M. G.//J. Mol. Biol. 1973. V. 76. P. 241.
32. Wodak S. J., Janin J.//Biochemistry. 1981. V. 20. P. 6544.
33. Quinto C., Quirago M., Swain W. F. et al.//Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1982. V. 79. P. 31.
34. Leicht M., Long C. L., Chandra T. et al.//Nature. 1982. V. 297. P. 655.
35. Naora H., Deacon N. J.//Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1982. V. 70. P. 6196.
36. Go H., Nosaka M.//Evolution of Catalytic Function. Cold Spring Harbor Lab. 1987. V. 52. P. 915.
37. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. 480 с.
38. Glover D. H.//Gene cloning. Mechanics of DNA Manipulation. L.; N. Y.: Chapman and Hall, 1984. 222 p.
39. Транскрипция и трансляция. Методы/Под ред. Б. Хеймса, С. Хиггинса. М.: Мир, 1987. 399 с.
40. Smith M.//Philos. Trans. Royal Soc. London. Ser. A. 1986. V. 317. № 1540. P. 295.
41. Dalbadie-McFarland G., Richards J. H.//Ann. Rev. Med. Chem. 1983. V. 18. P. 237.
42. Smith M.//Ann. Rev. Genet. 1985. V. 19. P. 423.
43. Shortle D., Boistein D.//Methods Enzym. 1983. V. 100. P. 457.
44. Loel L. A.//Cell. 1985. V. 40. P. 483.
45. Pine R., Huang P. C.//Methods Enzym. 1987. V. 154. P. 415.
46. Myers R. M., Lerman L. S., Maniatic T.//Science. 1985. V. 229. P. 242.
47. Itakura K., Rossi J. J., Wallace R. B.//Annu. Rev. Biochem. 1984. V. 53. P. 323.
48. Blöcker J., Frank R.//Biotechnology: Potentials and Limitations/Ed. Silver S. Dahlem Konferenzen, Berlin — Heidelberg — New York — Tokyo; Springer-Verlag, 1986. P. 41.
49. Wells J. A., Vasser M., Powers D. B.//Gene. 1985. V. 34. P. 315.
50. Boistein D., Shortle D.//Science. 1985. V. 229. P. 1193.
51. Winter G., Carter P., Bedouelle H. et al.//Biotechnology: Potentials and Limitations/Ed. Silver S. Dahlem Konferenzen. 1986. Berlin — Heidelberg — New York — Tokyo: Springer-Verlag, 1986. P. 55.
52. Carter P.//Biochem. J. 1986. V. 237. P. 1.
53. Zoller M. J., Smith M.//Methods Enzym. N. Y.: Acad. Press, 1983. V. 100. P. 468.
54. Zoller M. J., Smith M.//DNA. 1984. V. 3. P. 479.
55. Fersht A. R., Winter G. P.//Ciba. Found Symp. 111. L.: Pitman, 1985. P. 204.
56. Zoller M. J., Smith M.//Methods Enzym. 1987. V. 154. P. 329.
57. Kramer W., Fritz H. J.//Ibid. 1987. V. 154. P. 350.
58. Mandecki W.//Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. P. 7177.
59. Ефимов В. А., Мирских О. В., Чахмахчева О. Г., Овчинников Ю. А.//Биоорган. хим. 1985. Т. 11. С. 621.
60. Ефимов В. А., Мирских О. В., Чахмахчева О. Г., Овчинников Ю. А.//FEBS Lett. 1985. V. 181. P. 407.
61. Петренко В. А., Поздняков Н. Н., Киприянов С. М. и др.//Биоорган. хим. 1986. Т. 12. С. 1088.
62. Петренко В. А., Семенова Л. Н., Киприянов С. М. и др.//Там же. 1987. Т. 12. С. 1612.
63. Петренко В. А., Киприянов С. М., Семенова Л. Н., Болдырев А. Н.//Там же. 1987. Т. 13. С. 344.
64. Martin W. J., Davies R. W.//Biotechnology. 1986. V. 4. P. 890.
65. Moores J. C.//Anal. Biochem. 1987. V. 163. P. 1.
66. Gilson B. W., Beiman K.//Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. P. 1956.
67. Zvebil M. J., Barton G. J., Taylor W. R., Stenberg M. J.//J. Mol. Biol. 1987. V. 195. P. 957.
68. Voordouw G., Brenner S.//Eur. J. Biochem. 1986. V. 159. P. 347.
69. Finch P. W., Wilson R. E., Becon K. et al.//Nucl. Acids. Res. 1986. V. 14. P. 7695.
70. Schumaster G., Sizmann D., Haug H. et al.//Ibid. 1986. V. 14. P. 5713.
71. Fang G.-H., Kenigsberg P., Axley M. J. et al.//Ibid. 1986. V. 14. P. 8061.
72. Inouye S., Noguchi M., Sakaki Y. et al.//Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. P. 3154.
73. Perryman B., Kerner S. A., Bohlmeier T. J., Toberts R.//Biochem. Biophys. Res. Commun. 1986. V. 140. P. 981.

74. Saris C. J. M., Tack B. F., Kristensen T. et al.//Cell. 1986. V. 46. P. 201.
75. Takano E., Maki M., Hatanaka M. et al.//FEBS Lett. 1986. V. 208. P. 199.
76. Icho T., Sparrow C. P., Raetz C. B. H.//J. Biol. Chem. 1985. V. 260. P. 12078.
77. Icho T., Bulawa C. E., Raetz C. B. H.//Ibid. 1985. V. 260. P. 12091.
78. Овчинников Ю. А., Бродде Н. Е., Петрухин К. Е. и др.//Биохимия. 1986. Т. 51. С. 1491.
79. Baldwin T. O., Lin J.-W., Chen L. H. et al.//Bioluminescence and Chemiluminescence, New Perspectives. Proceeding of the IV International Biolum. and Chemilum. Symp., Freiburg, 1986, New York: John Wiley and Sons, 1987. P. 351.
80. Kugimiya W., Otani Y., Hashimoto Y., Takagi Y.//Biochem. Biophys. Res. Commun. 1986. V. 141. P. 185.
81. Tu C.-P. D., Qian B.//Ibid. 1986. V. 141. P. 229.
82. Hartig A., Ruis H.//Eur. J. Biochem. 1986. V. 160. P. 487.
83. Grennett H. E., Ledley F. D., Reed L. L., Woo S. L.//Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1987. V. 84. P. 5530.
84. Borgford T. Y., Beand N. Y.//Biochemistry. 1987. V. 26. P. 2480.
85. Schulz G. E., Shultz I., Tomaselli A. G. et al.//Eur. J. Biochem. 1986. V. 161. P. 127.
86. Sheell G. E., Lanett L. K., Lingrel J. B.//Nature. 1986. V. 321. P. 429.
87. Newgard C. B., Nakano K., Hwoeng P. K., Fletterick R. J.//Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. P. 8132.
88. Fischer E. H.//Bull. Inst. Pasteur. 1983. V. 87. P. 7.
89. Gilbert W.//Nature. 1978. V. 271. P. 501.
90. Neurath H.//Chemica Scripta. 1968. V. 26B. P. 221.
91. Hunter T., Cooper J. A.//Adv. Cyclic Nucleotide Res. 1984. V. 17. P. 443.
92. Takio K., Wade R. D., Smith S. B. et al.//Biochemistry. 1984. V. 23. P. 4207.
93. Nojima H.//FEBS Lett. 1987. V. 217. P. 187.
94. Brennan R. G., Weaver L. H., Mattheus B. W.//Chemica Scripta. 1986. V. 26B. P. 251.
95. Jaenicke R.//Progr. in Biophys. and Mol. Biol. 1987. V. 49. № 2—3, P. 117.
96. Barton G. J., Sternberg J. E.//Prot. Eng. 1987. V. 1. P. 89.
97. Kelly L., Halladay L. A.//Ibid. 1987. V. 1. P. 137.
98. Argos P., Mohanakao Y. K.//Methods Enzymol. 1986. V. 130. P. 185.
99. Argos P., Tucher A. D., Phillipson L.//Virology. 1986. V. 149. P. 208.
100. Argos P.//J. Molec. Biol. 1987. V. 193. P. 285.
101. Blundell T. L., Sibanda B. L., Sternberg M. Y. E., Thornton Y. M.//Nature. 1987. V. 326. P. 347.
102. Hubbard T. J., Blundell T. L.//Prot. Eng. 1987. V. 1. P. 159.
103. Sutcliffe M. J., Haneef I., Carney D., Blundell T. L.//Ibid. 1987. V. 1. P. 377.
104. Sutcliffe M. J., Hayes F. R. F., Blundell T. L.//Ibid. 1987. V. 1. P. 385.
105. Bryant S. H., Sternberg M. J. E.//J. Mol. Graphics. 1987. V. 5. P. 4.
106. Sternberg M. J. E.//NATO ASI Ser. Ser. A. 1987. V. 126. P. 141.
107. Jones T. A.//J. Appl. Cryst. 1978. V. 11. P. 268.
108. Novotny J., Auffray C.//Nucl. Acids Res. 1984. V. 12. P. 243.
109. Novotny J., Auffray C.//Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. P. 742.
110. Klein P., Jancquez J. A., Delisi C.//Math. Biosci. 1986. V. 81. P. 177.
111. Wilkinson A. J., Fersht A. R., Blow D. M., Winter G.//Biochemistry. 1983. V. 22. P. 3581.
112. Fersht A. R., Shi J. P., Wilkinson A. J. et al.//Angew. Chem. 1984. S. 96. B. 455.
113. Wilkinson A. J., Fersht A. R., Blow D. M. et al.//Nature. 1984. V. 307. P. 187.
114. Leatherbarrow R. J., Fersht A. R., Winter G.//Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. P. 7840.
115. Fersht A. R., Leatherbarrow R. J., Wells T. N. G.//Nature. 1986. V. 322. P. 284.
116. Wells T. N. C., Fersht A. R.//Biochemistry. 1986. V. 25. P. 1881.
117. Wells T. N. C., Ho C. K., Fersht A. R.//Ibid. 1986. V. 25. P. 6603.
118. Brown K. A., Brick P., Blow D. M.//Nature. 1987. V. 326. P. 416.
119. Fersht A. R., Leatherbarrow R. J., Wells T. N. C.//Phil. Trans. Royal Soc. London. Ser. A. 1986. V. 317. P. 305.
120. Bedouelle H., Carter P., Winter G.//Ibid. 1986. V. 317. P. 433.
121. Ho C. K., Fersht A. R.//Biochemistry. 1986. V. 25. P. 1891.
122. Fersht A. R.//Ibid. 1987. V. 26. P. 8031.
123. Fersht A. R.//Ibid. 1988. V. 27. P. 1577.
124. Fersht A. R., Knill-Jones J. W., Bedouelle H., Winter G.//Ibid. 1988. V. 27. P. 1581.
125. Johnes D. H., McMillan A. J., Fersht A. R.//Ibid. 1985. V. 24. 2. P. 5852.
126. Ward W. H. J., Jones D. H., Fersht A. R.//J. Biol. Chem. 1986. V. 261. P. 9576.
127. Carter P., Bedouelle H., Winter G.//Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. P. 1189.
128. Bedouelle H., Winter G.//Nature. 1986. V. 320. P. 371.
129. Pielak G. J., Mauk A. G., Smith M.//Ibid. 1986. V. 313. P. 152.
130. Pielak G. J., Oikawa K., Mauk A. G. et al.//J. Amer. Chem. Soc. 1986. V. 108. P. 2724.
131. Pielak G. J., Concar D. W., Moore G. R., Williams J. P.//Prot. Eng. 1987. V. 1. P. 83.
132. ten Kortenaar P. B. W., Adams P. J. M. H., Tesser G. I.//Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. P. 8279.
133. Wallace C. J. A., Cortesby B. E.//Prot. Eng. 1986. V. 1. P. 23.
134. Holzche D., Puncipio L., Conklin K. T. et al.//J. Biol. Chem. 1987. C. 262. P. 7125.
135. Culler R. L., Pielak G. J., Mauk A. G., Smith M.//Prot. Eng. 1987. V. 1. P. 95.
136. Mayo S. L., Ellis W. R., Crutchley R. J., Gray H. B.//Science. 1986. V. 233. P. 948.
137. Sakaki T., Shibata M., Yubusaki Y., Ohkawa H.//DNA. 1987. V. 6. P. 31.
138. Shimizu T., Hiram K., Takahashi M. et al.//Biochemistry. 1988. V. 27. P. 4138.

139. Goodin D. B., Mauk A. G., Smith M.//Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. P. 1295.
140. Fishel L. A., Villafranca J. E., Mauro J. M., Kraut J.//Biochemistry. 1987. V. 26. P. 351.
141. Craik C. S., Lovegman C., Fletcher T. et al.//Science. 1985. V. 228. P. 291.
142. Craik C. S., Roczniak S., Sprang S. et al.//J. Cell. Biochem. 1987. V. 33. P. 199.
143. Craj L., Craik C. S., Patthey A. et al.//Biochemistry. 1987. V. 26. P. 2616.
144. Estell D. A., Miller J. V., Graycar T. P. et al.//World Biotech. Rep. 1984. V. 2. P. 181.
145. Estell D. A., Graycar T. P., Miller J. V. et al.//Science. 1986. V. 233. P. 659.
146. Bott R. R., Ultsch M., Burnier J.//ACS Symp. Ser. 1987. V. 334. P. 139.
147. Wells J. A., Powers D. B., Bott R. R. et al.//Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1987. V. 84. P. 31.
148. Wells J. A., Cunningham D. C., Graycar T. P., Estell D. A.//Phil. Trans. Royal. Soc. London. Ser. A. 1986. V. 317. P. 415.
149. Wells J. A., Powers D. B.//J. Biol. Chem. 1986. V. 261. P. 6564.
150. Thomas P. G., Russel A. J., Fersht A. R.//Nature. 1985. V. 318. P. 375.
151. Russel A. J., Thomas P. G., Fersht A. R.//J. Mol. Biol. 1987. V. 193. P. 803.
152. Straus D., Raines R. T., Wawashima E. et al.//Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. P. 2272.
153. Raines R. T., Straus D. R., Gilbert W., Knowles J. P.//Phil. Trans. Royal. Soc. London. Ser. A. 1986. V. 317. P. 371.
154. Rainesi R. T., Sutton E. E., Straus D. R. et al.//Biochemistry. 1986. V. 25. P. 7142.
155. Petsko G. A., Dvaneport R. C., Frankel D., Raybhandary V. L.//Biochem. Soc. Trans. 1984. V. 12. P. 229.
156. Smith K. A., Nowlan S. F., Middleton S. A. et al.//J. Mol. Biol. 1986. V. 189. P. 227.
157. Middleton S. A., Kantrowitz E. R.//Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. P. 5866.
158. Nowlan S. F., Kantrowitz E. R.//J. Biol. Chem. 1985. V. 260. P. 14712.
159. Robey E. A., Schachman H. K.//Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. P. 361.
160. Robey E. A., Wente S. R., Markly D. W. et al.//Ibid. 1986. V. 83. P. 5934.
161. Schachman H. K.//Biochem. Soc. Trans. 1987. V. 15. P. 772.
162. Wente S. R., Schachman H. K.//Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1987. V. 84. P. 31.
163. Serpersu E. H., Shortle D., Mildvan A. S.//Biochemistry. 1986 V. 25. P. 68.
164. Serpersu E. H., Shortle D., Mildvan A. S.//Ibid. 1987. V. 26. P. 1289.
165. Uhlmann E., Smith J. A.//Nucleosides Nucleotides. 1987. V. 6. P. 331.
166. Hibler D. W., Stelowich N. J., Reynolds H. A. et al.//Biochemistry. 1987. V. 26. P. 6278.
167. Wilde J. A., Bolton P. H., Dell'Acqua M. et al.//Ibid. 1988. V. 27. P. 4127.
168. Travis J., Owen M., George P. et al.//J. Biol. Chem. 1985. V. 260. P. 4384.
169. Courtney M., Jallet S., Tissier J.-H. et al.//Nature. 1985. V. 313. P. 149.
170. Jallet S., Carvallo D., Tessier L. H. et al.//Prot. Eng. 1986. V. 1. P. 29.
171. Courtney M., Jallet S., Ressler J.-H. et al.//Phil. Trans. Royal. Soc. London. Ser. A. 1986. V. 317. P. 381.
172. Mas M. T., Resplandor L. E., Riggs A. D.//Biochemistry. 1987. V. 26. P. 5369.
173. Wilson C. A. B., Hardman N., Fothergill-Gilmore L. A. et al.//Biochem. J. 1987. V. 241. P. 609.
174. Mas M. T., Chen C. Y., Helzeman R. A., Riggs A. D.//Science. 1986. V. 233. P. 788.
175. Gardell S. J., Craik C. S., Hilvert D. et al.//Nature. 1985. V. 317. P. 551.
176. Hilvert D., Gardell S. J., Rutter W. R., Kaiser E. T.//J. Amer. Chem. Soc. 1986. V. 108. P. 5298.
177. Gardell S. J., Hilvert D., Barnett J. et al.//J. Biol. Chem. 1987. V. 262. P. 576.
178. Winther J. R., Keilland-Brandt M. C., Breddam K.//Carlsberg Res. Commun. 1985. V. 50. P. 273.
179. Kraut J.//Science. 1986. V. 231. P. 1123.
180. Villafranca J. E., Howell E. E., Oatley S. J. et al.//Phil. Trans. Royal Soc. London. Ser. A. 1986. V. 317. P. 405.
181. Prendergas N. J., Delcamp T. J., Smith P. L., Frusheim J. H.//Biochem. 1988. V. 27. P. 3664.
182. Michiro M., Jigami Y., Morikawa M., Tanaka H.//Biochem. Biophys. Acta. 1987. V. 911. P. 376.
183. Muraki M., Morikawa M., Jigami Y., Tanaka H.//Ibid. 1987. V. 916. P. 66.
184. Lawrence N. P., Altman S.//J. Mol. Biol. 1986. V. 191. P. 163.
185. Wolfes H., Alves J., Fliess A., et al.//Nucl. Acids. Res. 1986. V. 14. P. 9063.
186. Cronin C. N., Malcolm B. A., Kirsch J. E.//J. Amer. Chem. Soc. 1987. V. 119. P. 2222.
187. Clarke A. R., Wigley D. B., Chia W. N. et al.//Nature. 1986. V. 324. P. 699.
188. Clarke A. R., Wigley D. B., Barstow D. A. et al.//Biochem. Soc. Trans. 1987. V. 15. P. 152.
189. Murali C., Creaser E. H.//Prot. Eng. 1986. V. 1. P. 45.
190. Ghosh S. S., Bock S. C., Rokita S. E., Kaiser E. T.//Science. 1986. V. 231. P. 145.
191. Yohda M., Ohta S., Hisabori T., Kagava Y.//Biochem. Biophys. Acta. 1988. V. 992. P. 156.
192. Dalbadie-McFarland G., Cohen L. W., Riggs A. D. et al.//Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1982. V. 79. P. 6409.
193. Sigal I. S., Harwood B. G., Arentzen R.//Ibid. 1982. V. 79. P. 7157.
194. Sigal I. S., DeGrado W. F., Thomas B. J., Petteway S. R.//Biol. Chem. 1984. V. 259. P. 5327.
195. Dalbadie-McFarland G., Riggs A. D., Richards J. H.//Biochem. Soc. Trans. 1984. V. 12. P. 226.



196. Dalbadie-McFarland G., Naitzel J. J., Richards J. H.//Biochemistry. 1986. V. 25. P. 332.
197. Seeburg P. H., Colly W. W., Capon D. J. et al.//Nature. 1984. V. 312. P. 71.
198. Madgwick P. J., Waley S. G.//Biochem. J. 1987. V. 248. P. 657.
199. Gutteridge S., Sigal I., Thomas B. et al.//EMBO J. 1984. V. 3. P. 2737.
200. Niyagi S. K., Foote R. S., Murel R. J. et al.//J. Biol. Chem. 1986. V. 261. P. 10087.
201. Hartman F. C., Soper T. S., Miyogi S. K. et al.//Ibid. 1987. V. 262. P. 3496.
202. Voordouw G., DeVries P. A., Van Den Berg W. A. M., De Clerk E. P. J.//Europ. J. Biochem. 1987. V. 163. P. 591.
203. Tremble W. R., Vitanen P. V., Sarkar H. R. et al.//Biochem. Biophys. Res. Commun. 1984. V. 119. P. 860.
204. Vitanen P. V., Menick D. R., Sarkar H. R. et al.//Biochemistry. 1985. V. 24. P. 7628.
205. Naehaus J. M., Soppa J., Witgh J. K. et al.//FEBS Letts. 1985. V. 185. P. 83.
206. Sarkar H. R., Menicij D. R., Vitanen P. V. et al.//J. Biol. Chem. 1986. V. 261. P. 8914.
207. Menick D. R., Sarkar H. R., Poonian M. S., Kaback H. R.//Biochem. Biophys. Res. Commun. 1985. V. 132. P. 162.
208. Brooker R. J., Wilson T. H.//J. Biol. Chem. 1986. V. 261. P. 11765.
209. Menick D. R., Lee J. A., Brooker R. J. et al.//Biochemistry. 1987. V. 26. P. 1132.
210. Ragan E., Sarkar H. R., Vitanen P. V. et al.//Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. P. 6765.
211. Püttner I. B., Sarkar H. R., Poonian M. S., Kaback H. R.//Biochemistry. 1986. V. 25. P. 4483.
212. Kaback H. R.//Ibid. 1987. V. 26. P. 2071.
213. Tsuji F. I., Inouye S., Goto T., Sakaki Y.//Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. P. 8107.
214. Craig T. A., Watterson D. M., Prendergast F. G. et al.//J. Biol. Chem. 1987. V. 262. P. 3278.
215. Nishiyama M., Matsubara V., Yamamoto K. et al.//Ibid. 1986. V. 261. P. 14178.
216. Lentz M. R., Webster R. G., Air G. M.//Biochemistry. 1987. V. 26. P. 5351.
217. Wli X., Els M. C., Webster R. G., Air G. M.//Virology. 1987. V. 156. P. 253.
218. Rand K. N., Singhn H., Thogersen H. C., Gait M. J.//J. Biosci. 1985. № 1. P. 89.
219. Singh M., Heapej S., Gait M. J.//Prot. Eng. 1986. V. 1. P. 75.
220. Heapy S., Singh M., Gait M. J.//Biochemistry. 1987. V. 26. P. 1688.
221. Houla-Herin N., Hara H., Inouya M., Hirota Y.//Mol. Gen. Genet. 1985. V. 201. P. 499.
222. Yutani K., Ogasahara K., Tsujita T. et al.//J. Biol. Chem. 1987. V. 262. P. 13429.
223. Paluh J. L., Zalkin H., Belsch D., Weith H. L.//Ibid. 1985. V. 260. P. 1889.
224. Samson S. M., Chapman J. L., Belagaie R. et al.//Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1987. V. 84. P. 5705.
225. Hopkins S., Schirch V.//J. Biol. Chem. 1986. V. 261. P. 3363.
226. Yamano S., Tanaka K., Matsumoto K., Tohe A.//Mol. Gen. Genet. 1987. V. 210. P. 413.
227. Bulis J., Saraswat L. D., Taylor S. S.//Biochem. 1988. V. 27. P. 1570.
228. Привалов П. Л.//Бнофизика. 1987. Т. 39. С. 742.
229. Bechtel W. J., Shellman J. A.//Biopolymers. 1987. V. 26. P. 1859.
230. Pfeil W.//Mol. Cell. Biochem. 1981. V. 40. P. 3.
231. Lale S. E., Klibanov A. M.//Biotechnol. Bioeng. 1983. V. 25. P. 2221.
232. Брандтс Дж. Ф.//Структура и стабильность биологических макромолекул. М.: Мир. 1973. С. 174.
233. Matthew J. B., Gurd R. F. N.//Meth. Enzym. 1986. V. 130. P. 437.
234. Goldenberg D. P.//J. Cell. Biochem. 1985. V. 29. P. 321.
235. Torchilin V. P., Maksimenko A. V., Smirnov V. N., et al.//Biochim. Biophys. Acta. 1979. V. 567. P. 1.
236. Кутузова Г. Д., Угарова Н. Н., Березин И. В.//Успехи химии. 1984. Т. 53. С. 1852.
237. Bull H. B., Breese R.//Arch. Biochem. Biophys. 1973. V. 158. P. 681.
238. Stellwagen E., Wilgus H.//Nature. 1978. V. 275. P. 342.
239. Ponnuswamy P. K., Muthusamy R., Manavalan P.//Int. J. Biol. Macromol. 1982. V. 4. P. 186.
240. Ikaï A.//J. Biochem. 1980. V. 88. P. 1895.
241. Zuber H.//Structural and Functional Aspects of Enzyme Catalysis./Eds H. Eggerer, R. Huber. Berlin — Heidelberg — New York: Springer Verlag, 1981. P. 114.
242. Ward D. P., Moo-Young M.//Biotech. Adv. 1988. V. 6. P. 39.
243. Merkler D. J., Farrington G. K., Wedler F. C.//Int. J. Peptide Protein Res. 1981. V. 18. P. 430.
244. Atkinson A.//J. Appl. Chem. Biotechnol. 1976. V. 26. P. 577.
245. Кутузова Г. Д., Угарова Н. Н., Березин И. В.//Итоги науки и техники. Сер. биотехнология. М.: Изд-во ВИНТИ, 1986. Т. 5. С. 5.
246. Stellwagen E.//Enzyme Eng. 1984. V. 234. P. 1.
247. Chotia C.//Nature. 1975. V. 254. P. 304.
248. Bash P. A., Singh U. C., Langridge R., Kollman P. A.//Science. 1987. V. 236. P. 564.
249. Wetzel R.//Trends. Biotechn. 1987. V. 12. P. 478.
250. Hartley B. S.//Phil. Trans. Royal Soc. London. Ser. A. 1986. V. 317. P. 321.
251. Richardson J.//Adv. Prot. Chem. 1981. V. 34. P. 154.
252. Pantoliano M. W., Ladner R. C., Bryan P. N. et al.//Biochemistry. 1987. V. 26. P. 2077.
253. Argos P.//J. Mol. Biol. 1987. V. 197. P. 331.
254. Yang D. S. C., Sax M., Chakrabartty A., Hew C. L.//Nature. 1988. V. 333. P. 232.
255. Mitchison C., Baldwin R. L.//Proteins: Struct. Funct. Genet. 1986. V. 1. P. 23.

256. *Qucrol E., Parrilla A.*//Enz. Microb. Technol. 1987. V. 9. P. 238.
257. *Perry L. J., Wetzel R.*//Science. 1984. V. 226. P. 555.
258. *Matthews B. W.*//Biochem. 1987. V. 26. P. 6885.
259. *Dill K. A.*//Prot. Eng. 1987. V. 1. P. 369.
260. *Rechsteiner M., Rogers S., Rote K.*//TIBS. 1987. P. 390.
261. *Rote K. V., Rechsteiner M.*//J. Biol. Chem. 1986. V. 261. P. 15430.
262. *Katznelson R., Kulka R. G.*//Eur. J. Biochem. 1985. V. 146. P. 437.
263. *Rogers S., Wells R., Rechsteiner M.*//Science. 1986. V. 234. P. 364.
264. *Baker J. M., Dice J. F.*//Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. P. 5830.
265. *Bachmair A., Finley D., Varshavsky A.*//Science. 1986. V. 234. P. 179.
266. *Stadman E. E.*//Trends Biochem. Sci. 1986. V. 11. P. 11.
267. *Grütter M. G., Grag T. M., Weaver L. H. et al.*//J. Mol. Biol. 1987. V. 197. P. 349.
268. *Alber T., Gray T. M., Weaver L. H. et al.*//NATO ASI Ser A. 1987. V. 126. P. 251.
269. *Alber T., Grütter M. G., Gray T. M. et al.*//UCLA Symp. Mol. Cell. Biol. New Ser., 1985. V. 39. P. 307.
270. *Alber T. M., Sun Doo-pin, Nye J. A. et al.*//Biochemistry. 1987. V. 26. N 13. P. 3754.
271. *Shortle D., Lin B.*//Genetics. 1985. V. 110. P. 539.
272. *Matsumura M., Rataoka Sh., Aiba Sh.*//Mol. Gen. Genet. 1986. V. 204. P. 355.
273. *Yutani K., Ogasahara K., Sugino Y.*//Adv. Biophys. 1985. V. 20. P. 13.
274. *Cunningham B. C., Wells J. A.*//Prot. Eng. 1987. V. 1. P. 319.
275. *Wetzel R. B.*//Europ. Pat. Appl. 1986. EP 155. 832.
276. *Perry L. J., Wetzel R.*//Biochemistry. 1986. V. 25. P. 733.
277. *Perry L. J., Wetzel R.*//Prot. Eng. 1987. V. 1. P. 101.
278. *Villafranca J. E., Howell E. E., Voet D. H. et al.*//Science. 1983. V. 222. P. 782.
279. *Villafranca J. E., Howell E. E., Oatley S. J. et al.*//Biochemistry. 1987. V. 26. P. 2182.
280. *Sauer R. T., Hehir K., Stearman R. S., Weiss H. A. et al.* Ibid. 1986. V. 25. P. 5992.
281. *Pabo C. O., Suchanek E. G.*//Ibid. 1986. V. 25. P. 5987.
282. *Hecchi M. H., Sturtevant J. M., Sauer R. T.*//Proteins: Struct. Funct. Genet. 1986. V. 1. P. 43.
283. *Imanaka T., Shibasaki M., Takagi M.*//Nature. 1986. V. 324. P. 695.
284. *Yutani K., Akutsu H., Ogasahara K. et al.*//Biochem. 1987. V. 26. P. 5666.
285. *Matsumura M., Yasumura S., Aiba S.*//Nature. 1986. V. 323. P. 356.
286. *Estell D. A., Graycar T. P., Wells J. A.*//J. Biol. Chem. 1985. V. 260. P. 6518.
287. *Wigly D. B., Clark A. R., Dunn C. R. et al.*//Biochim. Biophys. Acta. 1987. V. 916. P. 145.
288. *Ramdas L., Sherman F., Nall D. T.*//Biochemistry. 1986. V. 25. P. 6952.
289. *Ramdas L., Nall B. T.*//Ibid. 1986. V. 25. P. 6959.
290. *Gilles A., Saint-Girons I., Monnot M. et al.*//Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. P. 5798.
291. *Matthews C. R., Crisanti M. M., Manz J. T., Gepner G. L.*//Biochemistry. 1983. V. 22. P. 1445.
292. *Beasty A. M., Hurle M. R., Manz J. T. et al.*//Ibid. 1986. V. 25. P. 2965.
293. *Perry K. M., Onuffer J. J., Touchette N. A. et al.*//Ibid. 1987. V. 26. P. 2674.
294. *Casal J. I., Ahern T. J., Davenport R. C. et al.*//Ibid. 1987. V. 26. P. 1258.
295. *Ahern T. J., Casal J. I., Petsko G. A., Klibanov A. M.*//Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1987. V. 84. P. 675.
296. *Bott R.*//World Biotechnol. Rep. 1985. V. 2. P. 51.
297. *Russel A. J., Fersht A. R.*//Nature. 1987. V. 328. P. 496.
298. *Sligar S. G., Egeberg K. D., Sage Y. T. et al.*//J. Amer. Chem. Soc. 1987. V. 109. P. 7896.
299. *Ferreira L. C. S., Schwarz V., Keck W. et al.*//Europ. J. Biochem. 1988. V. 171. P. 11.
300. *Crenn I., Ladant D., Guiso N. et al.*//Ibid. 1986. V. 159. P. 605.
301. *Hsiung H. M., Mayne N. G., Becker G. W.*//Biotechnology. 1986. V. 4. P. 991.

Московский государственный  
университет