

# Управляемая эволюция как подход к созданию эффективных биокатализаторов

С.Н.Загребельный

Новосибирский государственный университет

630090 Новосибирск, ул. Пирогова, 2, факс (383) 239 – 7101

Обобщены методические подходы к осуществлению модифицирования каталитических свойств ферментов с помощью различных приемов управляемой эволюции. Рассмотрен ряд конкретные примеры создания ферментов с новыми и улучшенными свойствами, включая повышение термостабильности, растворимости, субстратной специфичности, стереоселективности и т.д. Обсуждены перспективы дальнейшего развития технологии управляемой эволюции ферментов и белков с другими функциями.

Библиография — 67 ссылок.

## Оглавление

|                                                      |     |
|------------------------------------------------------|-----|
| I. Введение                                          | 307 |
| II. Основные приемы управляемой эволюции ферментов   | 307 |
| III. Эволюция термостабильности                      | 311 |
| IV. Эволюция растворимости и экспрессии белков       | 312 |
| V. Модифицирование субстратной специфичности         | 313 |
| VI. Стереоселективность и энантиоселективность       | 315 |
| VII. Селекция модифицированных вариантов генов       | 316 |
| VIII. Другие методы рекомбинации ДНК                 | 317 |
| IX. Рациональные подходы к модифицированию ферментов | 317 |
| X. Заключение                                        | 318 |

## I. Введение

Ферменты все чаще используются в промышленных технологических процессах. Их преимущества перед обычными катализаторами хорошо известны: понижение энергоемкости в силу значительно большей эффективности, уменьшение материалоемкости за счет высокой специфичности, упрощение стадий технологического процесса, связанных с выделением и очисткой продукта реакции, и т.д. Однако в ряде случаев эти преимущества превращаются в недостатки. Ферменты, как и все белки, подвержены необратимой денатурации при повышении температуры, при действии органических растворителей, при повышенных или пониженных значениях pH. Слишком высокая специфичность часто не позволяет применять ферменты для проведения однотипных реакций с широким набором субстратов, принадлежащих к одному классу соединений, но различных по строению. Поэтому встает задача модифицирования свойств ферментов с целью расширения возможностей их использования.

**С.Н.Загребельный.** Доктор биологических наук, профессор, декан факультета повышения квалификации НГУ.  
Телефон: (383)230 – 0656, e-mail: snz@post.nsu.ru  
Область научных интересов: молекулярная биология, биохимия, биотехнология.

Дата поступления 16 января 2004 г.

Современное состояние знаний о принципах организации белковых молекул не позволяет предсказывать их свойства при направленной замене отдельных аминокислотных остатков, хотя методы введения таких изменений разработаны на уровне модификации соответствующих генов достаточно хорошо. В последние годы предложены методы модифицирования ферментов путем внесения случайных изменений в структуру белковой макромолекулы. Таким образом получается большой набор различных структур, среди которых могут быть и оптимальные для решения конкретной задачи. Затем проводят селекцию молекул с предпочтительными свойствами. Подобные манипуляции повторяют в несколько последовательных этапов, так что в итоге может быть получен вариант, удовлетворяющий поставленной задаче. Такой подход называют «управляемой эволюцией». В настоящем обзоре на основе литературных данных 1993–2003 гг. рассмотрены различные варианты этого метода и на конкретных примерах оценены полученные результаты.

## II. Основные приемы управляемой эволюции ферментов

Модифицирование ферментов известно давно. В течение нескольких десятилетий для этого использовали в основном специальные химические методы, чтобы установить роль отдельных аминокислотных остатков в механизме каталитического действия ферментов.

Накопление данных о структуре генов, кодирующих ферменты, и развитие техники работы с генетическим мате-

риалом дали возможность модифицировать молекулы ферментов путем направленного мутагенеза. Это позволило более детально изучать структурно-функциональную организацию ферментов. Одновременно появились попытки модифицирования ферментов с целью улучшения их эксплуатационных свойств при использовании в промышленности. В результате сформировалось новое направление молекулярной биологии — «белковая инженерия».

Однако в настоящее время невозможно точно предсказать влияние той или иной аминокислотной замены на функцию белка. И это несмотря на многочисленные данные о трехмерной структуре ферментов, получаемые методом РСА, и развитие компьютерного моделирования (например, расчет молекулярной динамики). Именно поэтому столь интенсивное развитие получили методы модифицирования свойств ферментов в заданном направлении, основанные на введении случайных замен на уровне генов с последующей селекцией мутантных вариантов по заданному критерию. В многочисленных работах в этой области можно выделить несколько основных подходов.

### 1. Ступенчатое укорочение генов ферментов и негомологичная рекомбинация

Бенкович с соавт.<sup>1</sup> предложил комбинаторный метод в белковой инженерии, названный инкрементным (ступенчатым) укорочением. Для этого ген, кодирующий данный фермент, разбивают на неравные части двумя разными способами с использованием разных рестриктаз так, чтобы в одной паре фрагментов более длинным был тот, что кодирует N-концевую часть белка, а в другой паре больший размер имел фрагмент, кодирующий С-концевую часть белка. Фрагменты большего размера клонируют в разных плаزمидях. Таким образом получают перекрывающиеся фрагменты гена, которые можно модифицировать независимо. Затем каждый фрагмент укорачивают «с внутренней стороны» путем обработки экзонуклеазой. Так генерируют варианты с делециями во фрагментах гена, кодирующих N- и С-части белка. Полученные плазмиды вводят одновременно в одни и те же клетки, лишенные исследуемого фермента. Совместная экспрессия фрагментов гена приводила к восстановлению способности клеток расти на минимальной среде до тех пор, пока каталитический центр фермента не повреждался в результате укорочения фрагментов гена. Таким методом была проведена идентификация точек, по которым можно удалить часть внутренних участков полипептидной цепи без существенного ущерба для каталитических свойств фермента, и удалось превратить мономерный фермент (глицинамидрибонуклеотидформилтрансферазу *E. coli*, PurN) в его функциональный гетеродимер.

Очевидно, что предложенный способ позволяет более точно исследовать структурно-функциональную организацию фермента. В дальнейшем путем создания межвидовых функциональных гибридов (Incremental Truncation for Creation of Hybride Enzymes, ITCHY) были получены химерные ферменты независимо от степени гомологии ДНК. На рис. 1 приведена схема создания этим методом библиотек модифицированных вариантов генов.

Возможность такой негомологичной рекомбинации с образованием межвидовых функциональных гибридов продемонстрирована<sup>2</sup> на PurN и ее аналоге — ферменте GART человека (hGART), которые имеют лишь 50% гомологии на уровне ДНК. Были созданы ITCHY-библиотеки между аминоконцом PurN и карбокси-концом GART путем последовательного усечения кодирующих последовательностей экзонуклеазой III и лигированием («сшивкой») продуктов. Наиболее активный гибрид PurN-GART проявлял прибли-

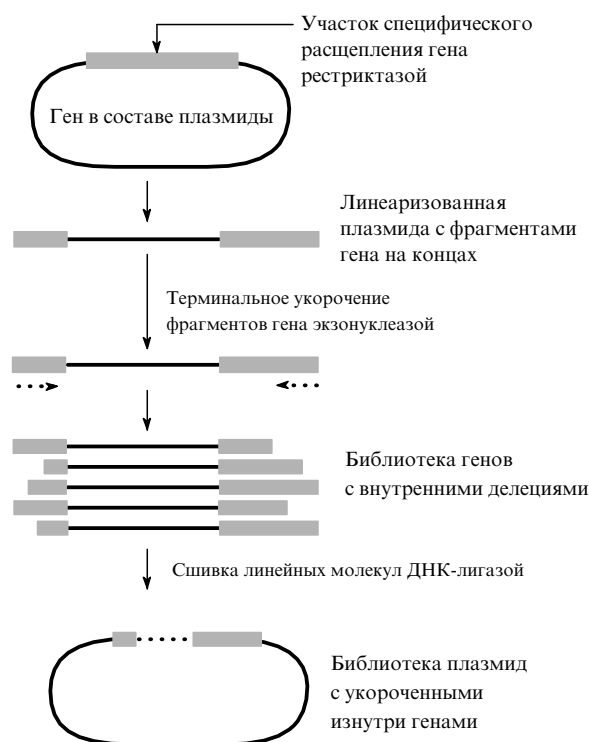


Рис. 1. Схема создания библиотеки модифицированных вариантов генов методом ступенчатого укорочения генов ферментов с негомологичной рекомбинацией.

зительно в 500 раз более низкую активность по сравнению с PurN дикого типа.

Позже были предложены<sup>3</sup> общие подходы к созданию библиотек укороченных фрагментов генов, основанные на возможности собирать молекулы ферментов из большого числа молекулярных конструктивных элементов. Для этого при проведении полимеразной цепной реакции (ПЦР) в состав реакционной смеси вводят  $\alpha$ -тионуклеозидтрифосфаты, чтобы в синтезируемую цепь включались  $\alpha$ -тиофосфатные звенья. При последующих операциях укорочения фрагментов генов экзонуклеаза «останавливается» на этих звеньях. Позиции, в которые попадают тиофосфатные остатки, генерируются случайно, и получается набор фрагментов, составляющих библиотеку. Ее компоненты далее могут подвергаться рекомбинации *in vitro* в любых сочетаниях. На примере PurN *E. coli* и ее аналога hGART получены функциональные гибриды с точками рекомбинации в областях с минимальной гомологией.

Преимущества молекулярной эволюции с негомологичной рекомбинацией *in vitro* требуют дальнейшего изучения.

### 2. Эволюция ферментов путем «перетасовки» семейств ДНК

Термин «перетасовка» ДНК (DNA shuffling) был предложен Стеммером.<sup>4,5</sup> На рис. 2 приведена схема создания этим методом библиотек генов. Основная идея подхода состоит в генерировании коротких фрагментов нуклеотидной последовательности гена, размножении фрагментов с использованием ПЦР с пониженной точностью (в качестве метода введения случайных мутаций), сборке полноразмерных последовательностей гена с помощью ПЦР и последующей селекции вариантов, удовлетворяющих условиям поставленной задачи. Фрагментация осуществляется путем гидролиза крупного гена (автор использовал ген размером  $\sim 1$  т.п.н.)

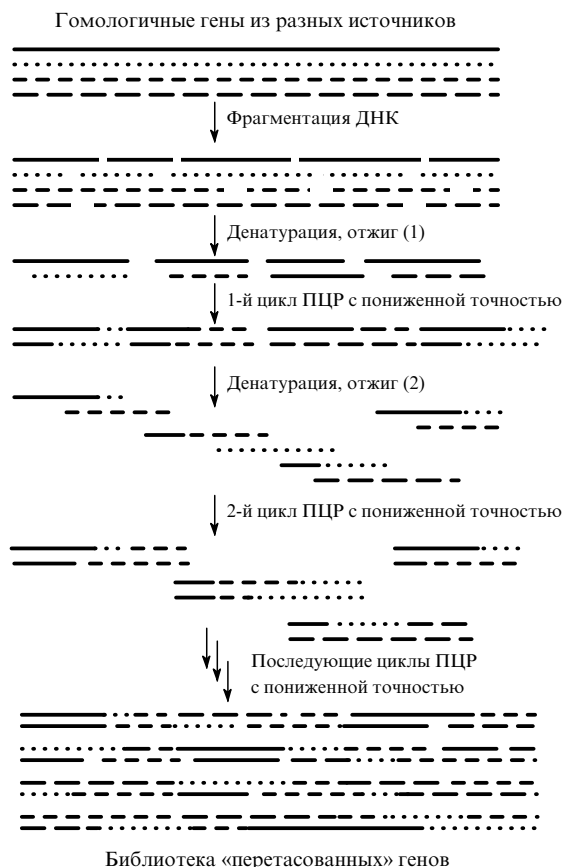


Рис. 2. Схема создания библиотеки модифицированных вариантов генов методом «перетасовки» семейств ДНК.

ДНКазой I до пула случайных фрагментов размером 10–50 пар оснований. Эти фрагменты далее могут быть собраны в полноразмерный ген путем многократных циклов гибридизации в присутствии ДНК-полимеразы. Фрагменты сами себе служат праймерами в связи с наличием гомологии, и рекомбинация происходит, когда фрагменты из одной копии гена иницируют синтез на другой копии (что приводит к переключению матрицы). В конце такого раунда процедур осуществляется селекция, схема которой выбирается в соответствии с задачей проекта. Отобранный лучший вариант (или несколько перспективных вариантов) подвергается повторному комплексу тех же процедур с последующей селекцией. После нескольких циклов «перетасовки» ДНК и селекции появляется удовлетворительный вариант, который далее и клонируют в векторах, обеспечивающих высокий уровень экспрессии. Стеймер продемонстрировал возможности описанного подхода на  $\beta$ -лактамазе и  $\beta$ -галактозидазе *E. coli*, а также на интерлейкине 1. «Перетасовку» можно проводить на одном гене, получая при этом его множественные варианты, а также на семействах гомологичных генов из разных источников, в том числе кодирующих ферменты, которые катализируют различные превращения близких по строению субстратов. В последнем случае повышается вероятность получения улучшенных вариантов, однако если число вариантов слишком большое, будет затруднен процесс селекции.

Следует отметить, что каждый этап «перетасовки» ДНК сопряжен с возникновением точечных мутаций. Это нежелательно при работе с крупными генами, поскольку количество вариантов, среди которых необходимо осуществлять отбор, существенно возрастает. Был предложен<sup>6</sup> новый протокол

«перетасовки» ДНК, повышающий точность процедуры на этапах фрагментации модифицируемого гена ДНКазой I, ПЦР и сборки полноразмерного гена. Этот протокол включает, в частности, замену ионов  $Mg^{2+}$  на  $Mn^{2+}$ , ограничение использования (где это возможно) ПЦР и применение ДНК-полимераз, характеризующихся более высокой точностью действия. К снижению частоты появления мутаций приводит также применение смеси полимераз *Taq* и *Pfu* (или *Pwo*) в соотношении 1 : 1. В итоге частоту мутаций удалось снизить до 0.05% и ниже, что в случае крупных генов дает возможность получения достаточного количества активных вариантов. Дальнейшее улучшение протокола может быть направлено на снижение количества циклов ПЦР и использование в последнем цикле только полимеразы *Pfu*, обладающей более высокой точностью по сравнению с полимеразой *Taq*.

«Перетасовка» семейств ДНК или эволюция путем рекомбинации *in vitro* природных гомологичных генов использовалась для улучшения ряда свойств ферментов. Тимидинкиназа вируса герпеса простого (HSV TK) используется для получения аналогов тимидина, пригодных в качестве противовирусных агентов. Гомологичный фермент человека обладает высокой специфичностью к тимидину, и его использование для синтеза ингибиторов репликации вируса малопродуктивно. Авторы работы<sup>7</sup> подвергли «перетасовке» последовательности двух наиболее близкородственных генов тимидинкиназы из разных штаммов этого вируса (78% гомологии по ДНК) для отбора химер с повышенной способностью фосфорилировать зидовудин (3'-азидотимидин, AzT). Четыре цикла «перетасовки» привели к двум клонам, которые в 500 раз повышали чувствительность ТК *E. coli* к AzT по сравнению с более активным ферментом HSV-1 и в 4000 раз — по сравнению с ферментом HSV-2. «Перетасовка» с участием HSV-2 повышала выход чувствительных клонов, несмотря на то что этот фермент более устойчив к AzT.

В реальных условиях улучшение комбинаций свойств ферментов столь же важно, как и усиление отдельных качеств. Перетасовка 26 генов субтилизины из различных источников (56–99% идентичности ДНК) описана в работе<sup>8</sup>. Субтилизины — протеиназы бактериального происхождения, которые используются в пищевой промышленности (для облагораживания жестких сортов мяса), в кожевенном производстве (при удалении волосяного покрова со шкур), в медицинской промышленности (для приготовления белковых гидролизатов для парентерального питания) и т.д. и представляют значительный практический интерес. Были использованы гены из различных бактерий с целью создания библиотеки химер, которые оценивали по четырем параметрам: активности при 23°C, термостабильности, устойчивости к органическим растворителям и зависимости активности от pH. Были идентифицированы химеры, обладающие всеми комбинациями свойств индивидуальных родительских вариантов ферментов, и найдены структуры с существенно улучшенными отдельными свойствами.

Методы направленной эволюции использовали<sup>9</sup> для исследования соотношения между стабильностью и активностью мезофильной эстеразы. Предыдущие исследования этих свойств в гомологичных ферментах показали, что рост температуры инактивации в условиях термического воздействия несовместим с сохранением высокой каталитической активности при низких температурах. Одна из причин этого кроется в различии конформационных состояний (в частности, гибкости — flexibility), отвечающих за высокую стабильность или активность соответственно. Шесть генераций статистического мутагенеза, рекомбинации и отбора существенно стабилизировали *n*-нитробензилэстеразу *Bacillus subtilis* (наблюдалось повышение температуры инактивации).

ции более чем на 14°C) без ослабления каталитической активности при более низких температурах. Анализ стабильности и активности большого количества случайных мутантов показал, что эти свойства не находятся в обратной корреляции, однако мутации, повышающие термостабильность с сохранением активности при низкой температуре, очень редки. Таким образом, эволюция одного свойства путем накопления единичных аминокислотных замен обычно происходит за счет ухудшения другого независимо от того, находятся ли эти свойства в обратной корреляции или не коррелируют вообще.

Управляемую эволюцию предлагается<sup>10</sup> использовать для модификации свойств самых разнообразных ферментов. При этом возможна быстрая оптимизация ферментов по одному или нескольким свойствам даже в отсутствие данных о структуре или механизме их действия. Эксперименты по управляемой эволюции используют простой дарвиновский алгоритм оптимизации с последовательным приближением. Молекулярное разнообразие создается случайным мутагенезом и/или рекомбинацией гена-мишени или семейства связанных генов. Модифицированные варианты идентифицируются селекцией, которая позволяет выбрать нужные варианты. Гены, кодирующие эти улучшенные ферменты, используются как исходные для последующего раунда эволюции.

При «перетасовке» семейств ДНК фрагментация ДНК с использованием рестриктаз (вместо ДНКазы I) повышает выход рекомбинантов<sup>11</sup> за счет увеличения частоты образования химер. Например, между двумя генами катехол-2,3-диоксигеназы (*xylE* и *nahH*) из разных источников, имеющими 84% идентичности последовательности ДНК, наблюдается повышение частоты образования химер с 1 до 100%. Гидролиз каждого из родительских генов несколькими наборами рестриктаз привел к образованию более разнообразных химерных структур, и полученные гибридные варианты обладали в 8–13 раз более высокой стабильностью при 50°C, чем родительские ферменты.

Описан<sup>12</sup> вариант технологии «перетасовки» ДНК — «перетасовка генов с использованием вырожденных олигонуклеотидов» (Degenerate Oligonucleotide Gene Shuffling, DOGS) — с повышением выхода целевых продуктов при молекулярной эволюции гена. Появление этой новой методики было обусловлено тем, что доля родительских (неперетасованных) вариантов гена при использовании фрагментации ДНК ДНКазой I оказалась слишком большой. В результате становится необходим трудоемкий скрининг для выбора химерных вариантов гена, особенно при перетасовке слабо родственных последовательностей ДНК. Новый подход опробован на примере семейства генов ксиланаз из различных источников. Эти ферменты представляют интерес для создания современных технологий переработки отходов деревообрабатывающей промышленности: для разрушения гемицеллюлоз и последующего использования продуктов гидролиза (например, в спиртовой промышленности). На основе гомологии аминокислотных последовательностей в структуре генов были выделены фрагменты и сконструированы вырожденные праймеры, которые далее использовались для амплификации этих фрагментов генов. Продукты амплификации были смешаны и подвергнуты совместной амплификации для получения полных последовательностей генов. При этом получена библиотека химерных вариантов. Степень мозаичности можно было варьировать, задавая соотношение исходных амплифицированных фрагментов. Полученная обширная библиотека содержала варианты, значительно различающиеся по температурному оптимуму. Анализ нуклеотидных последовательностей этих вариантов позволил установить происхождение фрагментов, вносящих вклад в новые свойства ферментов. Однако в данном случае

не встретился ни один вариант с измененным рН-оптимумом. Авторы объясняют это тем, что в активный центр фермента входят два остатка глутаминовой кислоты, выполняющие роль нуклеофила и кислотного катализатора. Замена любого из них приводит к потере каталитической активности. Подобная ситуация, вероятно, непреодолима при модифицировании ферментов данным методом.

Удобным дополнением к технике «перетасовки» ДНК является предложенный в работе<sup>13</sup> метод гетеродуплексной рекомбинации. Он позволяет создавать библиотеки химерных последовательностей ДНК, происходящих от двух гомологичных родительских последовательностей. Сначала получают *in vitro* гетеродуплексы из родительских последовательностей, а затем трансформируют ими клетки подходящего хозяина. В процессе внутриклеточной репарации образуются библиотеки химерных генов. При этом не происходит физического обмена фрагментами родительских генов. Гетеродуплексная рекомбинация генерирует множественные перекресты и может быть особенно полезной для рекомбинации больших генов или целых оперонов. Метод, однако, имеет ограничения: частота рекомбинаций тем выше, чем более удалены друг от друга позиции мутаций. Минимальное расстояние между мутированными звеньями, когда рекомбинация может еще происходить, равно 24 парам оснований.

### 3. Наращивание цепи со «случайным блужданием» (Staggered Extension Process, StEP)

Технология StEP была предложена авторами работы<sup>14</sup> (рис. 3). Полимеразная цепная реакция на гене целевого фермента инициируется одной парой праймеров с кратковременным этапом роста цепи. Затем продукты ПЦР подвергаются денатурации и последующему отжигу (тепловой денатурации — ренатурации), в ходе которого может происходить переключение синтезированных фрагментов на другие цепи матрицы, поскольку все фрагменты обладают достаточной степенью гомологии. Процесс продолжается до тех пор, пока не сформируется полноразмерный ген. Благодаря переключению растущих цепей с одной матрицы на другую формируются библиотеки генов для рекомбинации, которые содержат информацию из различных родительских генов. Данный подход был использован для получения гипертермостабильного варианта субтилизина E. Фермент дикого типа из мезофильного штамма *B. subtilis* имеет время полуинактивации при 65°C ~ 5 мин. Мутагенез с применением склонной к ошибкам ПЦР и последующая селекция привели к пяти вариантам с увеличением времени полуинактивации в 3–8 раз. Равные количества генов этих пяти вариантов были подвергнуты StEP-рекомбинации. Около 8000 клонов, экспрессирующих полученные варианты, были проанализированы на устойчивость при 75°C, отобраны три варианта с временами полуинактивации (при 65°C) в 25–50 раз больше, чем у дикого типа.

Эффективность StEP-рекомбинации близка к таковой для других методов рекомбинации *in vitro*, однако StEP может быть осуществлена в одной пробирке, поскольку разделения родительских последовательностей и продуктов рекомбинации не требуется.

### 4. Рекомбинация со случайными праймерами (Random Priming Recombination, RPR)

Предложен<sup>15</sup> еще более простой прием создания библиотек мутантных генов ферментов (рис. 4). Для этого копию подлежащего модификации гена (полученную путем ПЦР-амплификации) используют в качестве матрицы в ПЦР, а в качестве праймеров — случайный набор олигонуклеотидов размером в шесть нуклеотидных остатков (dpN<sub>6</sub>). В ходе

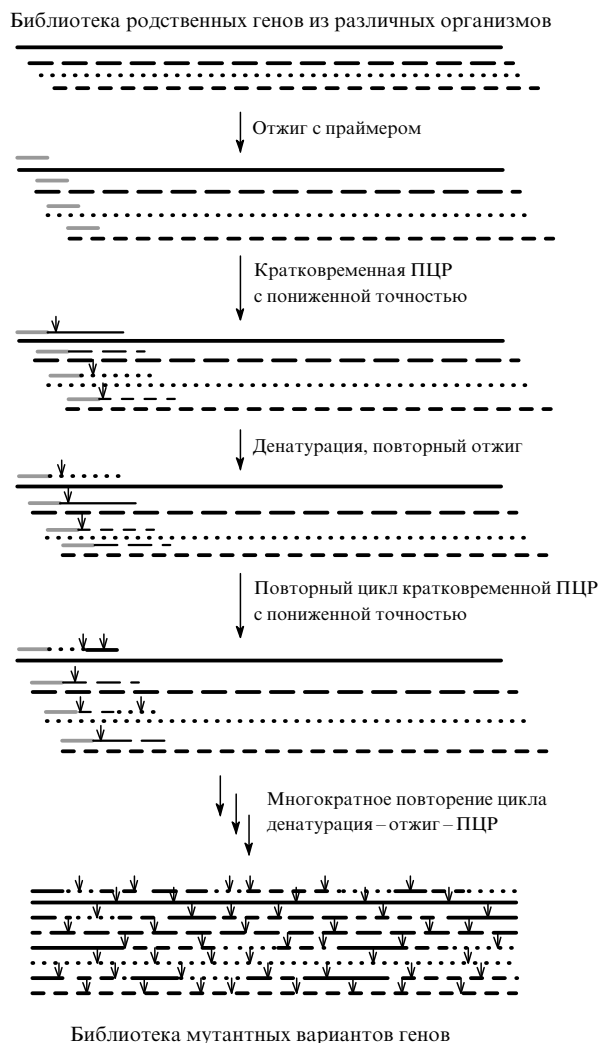


Рис. 3. Схема создания библиотеки модифицированных вариантов генов методом наращивания цепи со «случайным блужданием».  $\downarrow$  — положения случайных мутаций.

такой ПЦР с использованием склонной к ошибкам ДНК-полимеразы генерируется большое количество коротких фрагментов ДНК, которые оказываются комплементарными разным участкам последовательности матрицы. Эти фрагменты содержат точечные мутации благодаря как ошибочным включениям нуклеотидов полимеразой, так и несовершенной гибридизации праймеров с матричной цепью. В этих комплексах короткие фрагменты ДНК могут выступать праймерами друг для друга и собираются в полную последовательность многократным повторением таких раундов с последующим скринингом и селекцией. Предлагаемый метод имеет ряд преимуществ по сравнению с перетасовкой ДНК.

1. При рекомбинации методом RPR можно использовать как одонитевую, так и двуниевую ДНК в качестве матрицы без промежуточного синтеза полноразмерной второй цепи; потенциальные мутации возникают как на уровне одонитевых ДНК с использованием ДНК-полимераз с пониженной точностью, так и на уровне РНК с использованием РНК-зависимых ДНК-полимераз.

2. «Перетасовка» ДНК требует фрагментации ДНК ДНКазой I, которую необходимо тщательно удалять перед сборкой полноразмерного мутантного варианта гена.

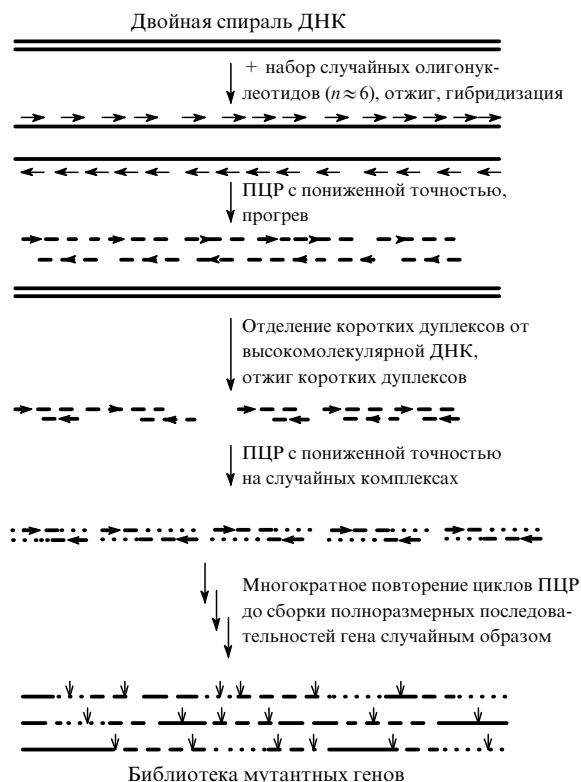


Рис. 4. Схема создания библиотеки модифицированных вариантов генов методом рекомбинации со случайными праймерами.  $\downarrow$  — точки мутаций за счет неточной полимеразной реакции.

3. Случайные синтетические праймеры одинаковы по длине и не вызывают преимущественного синтеза каких-либо фрагментов гена. Гетерогенность последовательности праймеров позволяет им образовывать гибриды с матричными цепями во многих позициях, так что каждый нуклеотид матрицы может быть с одинаковой частотой копирован или мутирован в процессе роста цепи. Случайное распределение коротких фрагментов растущей цепи ДНК вдоль матриц(ы) и точечных мутаций в каждом фрагменте ДНК гарантирует случайность распределения перекрестов и мутаций в потомстве полноразмерных генов.

4. Синтез ДНК со случайными праймерами не зависит от длины матрицы. Даже на коротких фрагментах ДНК (размером 200 нуклеотидов) синтез может быть инициирован столь же хорошо, как и на больших молекулах (например, на линеаризованной ДНК фага  $\lambda$ ). Это предоставляет уникальные возможности для инженерии коротких пептидов.

5. Поскольку родительская цепь ДНК используется только в виде матрицы для синтеза растущих одонитевых цепей, для проведения всего цикла требуется в 10–20 раз меньше исходной ДНК по сравнению с технологией «перетасовки» ДНК.

### III. Эволюция термостабильности

Повышение термостабильности — наиболее распространенное направление модифицирования свойств ферментов. Современные концепции изменения термостабильности обсуждаются в обзорах <sup>16, 17</sup>, где приведены данные о структурных особенностях термостабильных ферментов, дающие основания для создания рациональных подходов к их конструированию и применению в промышленности. Следует

отметить высокий уровень сходства первичных структур термофильных<sup>†</sup> и мезофильных ферментов, что лишний раз показывает неполноту современных структурных представлений об организации белковых молекул и ограниченность прогностических выводов о направлениях их изменения.

Модифицирование психрофильной протеазы — субтилизина S41 — описано в работе<sup>18</sup>. Ранее этот фермент был подвергнут трем раундам мутагенеза/рекомбинации с последующим скринингом. Был получен продукт с временем полуинактивации при 60°C в 500 раз больше, чем у фермента дикого типа. После дополнительных пяти раундов лабораторной эволюции продукт оказался в 1200 раз стабильнее по сравнению с ферментом дикого типа и в 20 раз — по сравнению с гомологичными мезофильными субтилизинами SSII и BPNP. Приблизительно половина из 13 аминокислотных замен в полученном варианте фермента — это мутации по остаткам серина, которые представлены в термофильных ферментах с меньшей частотой, чем в мезофильных. Вариант, полученный после восьмого (последнего) раунда управляемой эволюции, содержал замену Asp216Glu, не встречающуюся ни у мезофильных, ни у термофильных ферментов. Замена, близкая к нейтральной, приводила тем не менее к повышению термостабильности субтилизина еще приблизительно в два раза по сравнению с предыдущим вариантом.

Ферменты термофильных организмов часто оказываются недостаточно активными при низких температурах. Была предпринята попытка<sup>19</sup> повышения каталитической активности гипертермофильной индолглицерофосфатсинтетазы, одного из ферментов биосинтеза триптофана, из *Sulfolobus solfataricus* при средних температурах. Методами «перетасовки» ДНК были получены варианты *Sulfolobus solfataricus*, способные восстанавливать рост культуры *E. coli*, дефицитной по собственному ферменту. Удалось выяснить, что причиной низкой активности термофильного фермента при пониженных температурах является медленная диссоциация продукта реакции. В модифицированных вариантах фермента эта стадия существенно ускоряется, что приводит к повышению каталитической активности при минимальном снижении термостабильности. Таким образом, методы молекулярной эволюции позволяют в некоторых случаях дополнительно выяснять структурные причины модифицированных свойств ферментов.

Адаптация термофильного фермента ксилонизомеразы из *Thermus thermophilus* к нормальным температурам была проведена аналогичным образом.<sup>20</sup>

Молекулярная эволюция оксидазы фруктозил-аминокислот из *Corinebacterium sp.* (штамм 2-4-1) изучена в работе<sup>21</sup>. Этот фермент рассматривается в качестве кандидата в аналитические реагенты для определения неферментативного «гликирования» белков в клиническом биохимическом анализе.<sup>‡</sup> Авторы использовали мутагенез *in vivo* путем трансформации штамма *E. coli* XL1-Red плазмидой, содержащей ген оксидазы фруктозил-аминокислот.<sup>§</sup>

<sup>†</sup> Темины «термофильный», «мезофильный» и «психрофильный» означают, что предпочтительными для функций ферментов являются повышенные, нормальные и пониженные температуры соответственно; нормальными принято считать температуры около 37°C.

<sup>‡</sup> Термин «гликирование» вводится для обозначения неферментативной модификации белков (в отличие от гликозилирования). Это явление возникает при диабетических процессах в организме и имеет значительную диагностическую ценность для оценки состояния пациента в ходе терапии.

<sup>§</sup> *E. coli* XL1-Red — мутантный штамм, лишенный генов *mutS*, *mutD* и *mutT*, которые участвуют в репарации ДНК. Скорость мутаций в этом штамме в 5000 раз выше, чем у штамма дикого типа (см. каталог фирмы STRATAGENE).

После отбора клонов с модифицированным ферментом проводили четыре раунда мутагенеза и селекции; в результате удалось получить клон, экспрессирующий фермент, который сохранял 94% активности при 47°C (10 мин инкубации) против 1% для фермента дикого типа. Использованный мутагенез *in vivo* имеет ряд преимуществ перед ПЦР с пониженной точностью, однако этот подход не охватывает всех возможностей, которые предоставляет создание и использование библиотек мутантных генов.

Повышение термостабильности с одновременным увеличением каталитической активности описано<sup>22</sup> для амидазы D-аминокислот из почвенной бактерии *Ochrobactrum anthropi* SV3, которая способствует получению оптически чистых аминокислот при синтезе фармацевтических препаратов, агрохимикатов и пищевых добавок. В отличие от аналогов из других источников этот фермент катализирует превращение широкого круга субстратов (амидов аминокислот), в том числе и с объемной боковой цепью. Ген фермента подвергали молекулярной эволюции и после двух раундов ПЦР-мутагенеза и селекции получили вариант с повышенной на 5°C температурой денатурации и с более высокой каталитической эффективностью.

#### IV. Эволюция растворимости и экспрессии белков

При использовании ферментов в органическом синтезе встает проблема, связанная с их денатурацией в органических растворителях. Аналогичные трудности возникают и при создании моющих средств, в состав которых вводят протеазы и липазы, подверженные денатурации в присутствии детергентов. В связи с этим предпринимались попытки создать ферменты, устойчивые к органическим растворителям. В частности, субтилизин модифицировали методами молекулярной эволюции.<sup>23</sup> Для этого использовали случайный мутагенез, а в качестве генератора мутаций применялась полимеразная цепная реакция. Был отобран вариант фермента PC3, в 130 раз превосходящий по активности фермент дикого типа (субтилизин E) в среде с содержанием 40% ДМФА. Активность сохранялась и в среде с 85% ДМФА. Как показало изучение первичной структуры отобранного варианта, все 10 аминокислотных замен локализовались вблизи активного и субстрат-связывающего центров фермента. Семь из них встречаются в других вариантах субтилизина из разных штаммов продуцента. Впоследствии удалось еще более повысить устойчивость субтилизина к органическому окружению и его термостабильность.<sup>24,25</sup> В библиотеке клонов субтилизина удалось найти<sup>8</sup> штаммы, продуцирующие ферменты с более удобным для целей технологического применения pH-оптимумом и одновременно с устойчивостью к растворителям (ДМФА).

Была предпринята попытка<sup>26</sup> улучшить эксплуатационные качества глюкозодегидрогеназы *Bacillus licheniformis*, которая служит альтернативным реагентом для определения глюкозы и является компонентом, обеспечивающим регенерацию кофактора (NAD<sup>+</sup>) в системах ферментативного синтеза с применением NAD<sup>+</sup>-зависимых дегидрогеназ. С помощью методов «перетасовки» семейств ДНК удалось получить вариант глюкозодегидрогеназы, лишенный склонности к диссоциации при высоких значениях pH. Исследование первичной структуры полученного варианта показало, что он содержал всего одну аминокислотную замену по сравнению с ранее полученным вариантом, который, в свою очередь, отличался от фермента дикого типа также одной заменой. При этом значительно повысилась и термостабильность фермента.

При создании суперпродуцентов белковых продуктов возникают проблемы, связанные с образованием нераство-

римых гранул этих белков внутри клеток продуцента — так называемых «тел включения». Их появление обычно обусловлено неправильной пространственной укладкой образующихся белковых молекул в условиях их высокой концентрации в клетке. Следствием этого являются технологические трудности при выделении целевых продуктов и их последующей «переукладки» в нативную и функционально активную структуру.

Технологию молекулярной эволюции можно использовать для решения и этой проблемы. Наибольшие сложности при отборе вариантов белков, обладающих способностью к «правильной» укладке, представляет процедура селекции. Разработаны два перспективных подхода к селекции по растворимости и экспрессии белков. В одном из них целевой белок экспрессируется в виде рекомбинантного продукта с полной последовательностью хлорамфеникол-ацетилтрансферазы (CAT) на N-конце.<sup>27</sup> Было показано, что при присоединении CAT к нерастворимым белкам наблюдается существенно большее понижение устойчивости к хлорамфениколу, чем при присоединении к растворимым белкам. Это свойство дает возможность отбирать варианты с повышенной растворимостью. Так был отобран растворимый мутант интегразы ВИЧ из пула нерастворимых конструкторов дикого типа.

Другой метод заключается в присоединении целевого белка к N-концу белка GFP<sup>†</sup> (см.<sup>28</sup>). Флуоресценция GFP в составе таких рекомбинантов связана с правильной укладкой присоединенного белка. Полезность GFP как репортерного белка была подтверждена управляемой эволюцией укладки и продемонстрирована на различных примерах. После нескольких раундов «перетасовки» ДНК с последовательностью дикого типа были отобраны хорошо растворимые варианты белков (Н-субъединицы ферритина лягушки-быка и мутантная форма белка V бактериофага F1 Cys33Thr), которые при экспрессии в *E. coli* обычно агрегируют из-за неправильной укладки. Большим преимуществом предложенных подходов перед мутагенезом со скринингом по функциональной активности является отсутствие необходимости трудоемкого скрининга. Однако проверка отобранных таким способом вариантов на функциональную активность оказывается все же необходимой, поскольку растворимость химерного белка или правильная укладка репортерного белка не гарантируют сохранения активности целевым белком.

Молекулярная эволюция со скринингом на основе GFP применялась<sup>29</sup> для экспрессии антигена Rv2002 *Mycobacterium tuberculosis* в растворимом виде (обычно этот белок экспрессируется в *E. coli* в виде тел включения). Удалось получить необходимые для детальных структурных исследований количества препарата в растворимой форме.

Этот же подход использовали<sup>30</sup> для создания высокоэффективного продуцента фрагментов гена белка оболочки ВИЧ1. Были сконструированы N-концевые рекомбинанты фрагмента белка gp120 ВИЧ1, содержащего важные иммунодоминантные детерминанты вируса, с GFP, которые подвергали «перетасовке» ДНК в сочетании с ПЦР с пониженной точностью. Среди 300 000 колоний клеток отбирали колонии со сплошной флуоресценцией. Была найдена лишь одна такая колония (флуоресцирующий белок был распределен по всему объему клетки). Последующий анализ показал, что в этих условиях уровень синтеза целевого продукта составляет ~15% от общего белка клетки. Используемый подход привел к желаемому результату, несмотря на отсутствие функционального теста на целевой продукт.

<sup>†</sup>GFP — Green Fluorescent Protein — зеленый флуоресцирующий белок, часто используемый в качестве репортерного белка при конструировании рекомбинантных штаммов микроорганизмов.

Круг задач, решаемых методами молекулярной эволюции ферментов, весьма разнообразен. Авторы работы<sup>31</sup> пытались повысить устойчивость β-глюкуронидазы (GUS) к глутаровому альдегиду для ее применения в качестве репортера при изучении экспрессии генов в клетках трансгенных растений. Обычно используемая для этих целей система β-галактозидазы в данном случае непригодна из-за синтеза этими клетками собственного фермента. β-Глюкуронидаза *E. coli* также не очень удобна из-за чувствительности к глутаровому альдегиду и формальдегиду, используемым при фиксации исследуемой ткани для сохранения ее структуры. Эти и ряд других ограничений препятствовали использованию β-глюкуронидазы в эукариотических системах в качестве репортерного фермента. Путем молекулярной эволюции фермента удалось понизить чувствительность β-глюкуронидазы к альдегидам. Уже после одного раунда ПЦР с пониженной точностью и двух раундов «перетасовки» ДНК выделен мутантный вариант GUS, устойчивый к более высоким (в ~80 раз) концентрациям глутарового альдегида. Хотя известно, что глутаровый альдегид модифицирует белки за счет образования поперечных сшивок по остаткам лизина, лишь одна из восьми замен происходила по этой аминокислоте, а остальные семь — картированы на поверхности белка вблизи остатков лизина. По-видимому, поверхностные аминокислотные остатки существенно влияют на возможность модифицирования глутаровым альдегидом.

Этим же методом достигли повышения уровня экспрессии лакказы *Myceliophthora thermophila* в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae*.<sup>32</sup> Лакказы представляют значительный коммерческий интерес как лигнинолитические ферменты, используемые для деградации ароматических углеводов. Такая задача часто возникает при разработке технологии биоремедиации территорий, загрязненных нефтепродуктами. Попытки создания удобных для промышленного культивирования штаммов с высоким уровнем продукции лакказы не всегда приводят к желаемому результату. Однако с помощью управляемой эволюции удалось повысить уровень активности фермента в дрожжах в 170 раз (за счет повышения продукции фермента и с учетом 8-кратного увеличения его каталитической активности). Наиболее эффективным (приводящим к 10-кратному повышению общей активности) оказалось возникновение сайта, опознаваемого протеазой Kex2 в C-концевом участке процессинга белка. Так экспрессируемый белок приспосабливается к процессингу в гетерологичном хозяине.

## V. Модифицирование субстратной специфичности

При конструировании биокатализаторов для промышленного использования все чаще возникает задача подстройки ферментов к субстратам, с которыми они не встречаются в природе.

Эффективность методов молекулярной эволюции при модифицировании субстратной специфичности была убедительно продемонстрирована<sup>33</sup> на примере повышения фукозидазной активности β-галактозидазы. Гликозиды фукозы, 6-дезоксигалактозы, очень слабо расщепляются β-галактозидазой. За восемь раундов «перетасовки» ДНК удалось улучшить соотношение между β-галактозидазной и β-фукозидазной активностями фермента в 1000 раз.

С целью улучшения эксплуатационных свойств модифицировали ксилоизомеразу из термофильной бактерии *Thermotoga neapolitana*.<sup>34</sup> обладающую также глюкоизомеразной активностью, благодаря чему она используется в производстве глюкозо-фруктозных сиропов — одним из наиболее крупномасштабных промышленных биотехнологических процессов. Этот фермент значительно менее эффек-

тивно катализирует изомеризацию глюкозы во фруктозу, чем ксилоты в ксилулозу. По этой причине предпринимаются попытки модифицирования фермента для повышения его каталитической эффективности по отношению к глюкозе. «Улучшением» эксплуатационных свойств фермента является также повышение активности его термофильных вариантов при умеренных температурах и смещение pH-оптимума активности в область более низких значений pH. Последнее необходимо для упрощения схемы процесса, поскольку предшествующая стадия — осахаривание крахмала — осуществляется с использованием глюкоамилазы, работающей в слабокислой среде. Управляемой эволюции подвергали ранее полученный вариант и за два раунда ПЦР-мутационеза и селекции по активности (при умеренных температурах и необходимых значениях pH) получили два новых варианта, существенно более активных при всех температурах и pH и со сдвигом pH-оптимума на 0.5 в нужную область.

Проведены исследования по модифицированию субстратной специфичности аспаратаминотрансферазы.<sup>35</sup> Использовалась комбинация «перетасовки» ДНК и селекции в ауксотрофном штамме *E. coli*,<sup>†</sup> при этом удалось существенно повысить специфичность фермента к аминок- и кетокислотам с разветвленной цепью в β-положении. Через пять раундов селекции один из мутантов имел в  $10^5$  раз более высокое отношение  $k_{кат}/K_M$  по сравнению с ферментом дикого типа для неприродных субстратов и 30-кратное понижение каталитической эффективности по отношению к основному субстрату. Этот мутантный вариант содержал 13 замен аминокислотных остатков, шесть из которых обеспечивали 80–90% эффекта. Пять из этих шести замен были устойчивыми и сохранялись в пяти мутантах, проявлявших наиболее высокую эффективность по отношению к β-разветвленным субстратам, а один из шести остатков расположен на расстоянии прямого взаимодействия с субстратом. Таким образом, дальние взаимодействия в молекуле белка могут вносить существенный вклад в функциональные свойства, что затрудняет использование рационального подхода к направленному модифицированию ферментов.

Получены мутантные варианты цефалоспорициназы из *Pseudomonas* SY-77,<sup>36, 37</sup> позволяющие за одну ферментативную стадию получать 7-аминоцефалоспориновую (7-ACA) или 7-аминодезацетоксицефалоспориновую (7-ADCA) кислоты, используемые при модифицировании антибиотиков ряда цефалоспоринов. Решение задачи существенно улучшает экономику и экологию промышленного процесса производства цефалоспоринов. Эти кислоты получают дезацелированием цефалоспоринов C и адипинил-7-ADCA соответственно (рис. 5). Удаление ацильного остатка боковой цепи антибиотика катализирует глутарилацилаза, которая, однако, проявляет слабую активность к остаткам адипиновой кислоты. Получен мутантный вариант фермента, у которого соотношение активностей к остаткам адипиновой и глутаровой кислот увеличено в 10 раз; тем самым существенно расширяются возможности применения ферментов в модифицировании антибиотиков пенициллинового и цефалоспоринового рядов.

Модифицирование специфичности фитоендесатуразы *Rhodobacter sphaeroides* описано в работе<sup>38</sup>. Этот фермент катализирует последовательную дегидрогенизацию фитоена в биохимическом пути образования изопреноидов, как показано на рис. 6. У многих бактерий он останавливается на

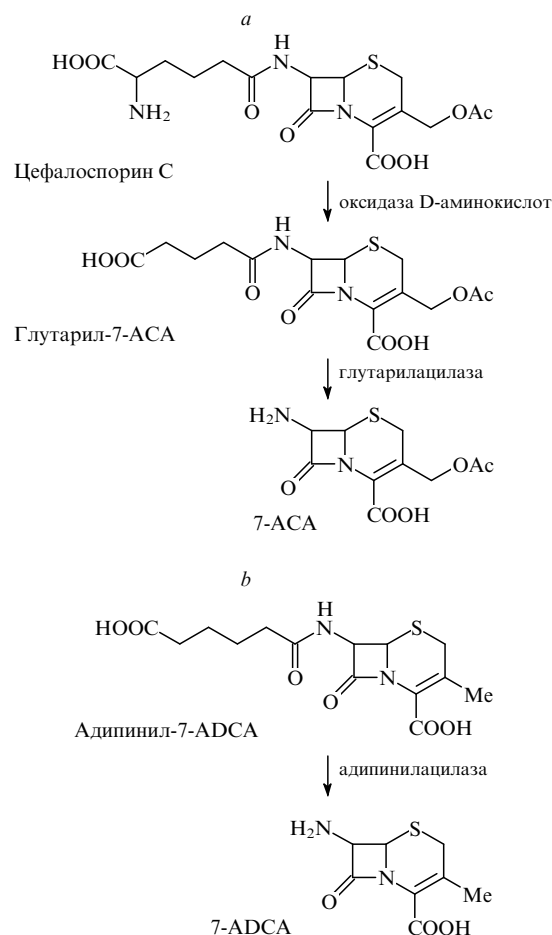


Рис. 5. Получение деацелированных цефалоспоринов с помощью глутарилацилазы (а) и адипинилацилазы (б).

стадии образования нейроспорина, как и у *Rhodobacter sphaeroides*. Продукт следующей стадии дегидрогенизации — ликопин — является более ценным, поскольку имеет более выраженные антиоксидантные свойства, в связи с чем

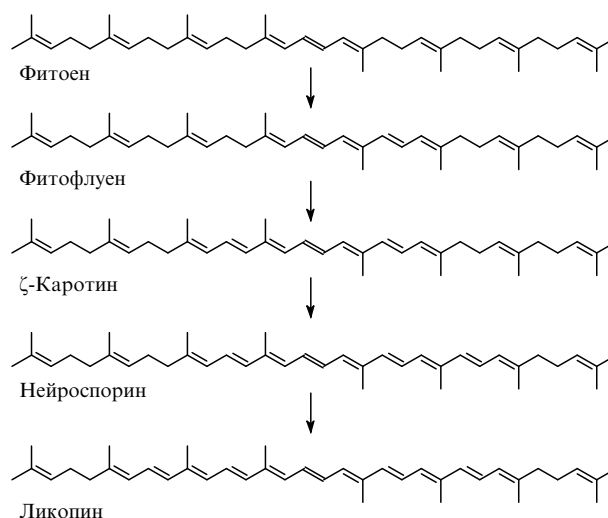


Рис. 6. Схема последовательных стадий дегидрогенизации фитоена в процессе образования ликопина под действием фитоендесатуразы.

<sup>†</sup> В данном случае был специально сконструирован штамм с поврежденным опероном биосинтеза изолейцина. Это повреждение можно было компенсировать за счет придания аспаратаминотрансферазе способности катализировать переминирование аминокислот с разветвленной боковой цепью.

используется как компонент пищевых добавок. Авторы путем управляемой эволюции получили вариант фермента *Rhodobacter sphaeroides*, способный синтезировать ликопин.

Задача была решена за два раунда статистического мутагенеза с последующей селекцией, причем модифицированию подвергался фермент, относящийся к семейству продуцентов нейтроспорина, в то время как большинство фитоендесатураз (90% известных ферментов) относятся к другому семейству белков. Гомология первичной структуры между этими семействами относительно невелика (менее 60%). Тем не менее модифицирование специфичности достигается относительно легко: уже после одной замены был получен вариант с продукцией ликопина 39%. Окончательный вариант (после еще двух раундов) продуцировал 90% ликопина. Авторами работ<sup>39,40</sup> получены варианты ферментов, способные катализировать синтез изопrenoидов C<sub>35</sub> и C<sub>40</sub>, что открывает путь к синтезу новых аналогов природных производных каротинов.

В последние годы достигнут значительный прогресс в расшифровке биохимических путей микробной деградации ароматических соединений различной природы, относящихся к распространенным поллютантам. Особое внимание направлено на создание штаммов микроорганизмов, способных эффективно осуществлять деградацию этих соединений в природных условиях, что можно использовать для биоремедиации загрязненных территорий. С этой целью предприняты попытки<sup>41</sup> расширения круга субстратов бифенилдиксигеназы с помощью метода рекомбинации со случайными праймерами. За два раунда манипуляций над геном *bphA1 Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 были выделены варианты ферментов с новыми свойствами, в частности способные окислять не только полихлорбифенилы, но и дибензофуран, дибензо-*n*-диоксин, дибензотиофен, флуорен, т.е. соединения, трудно утилизируемые исходным штаммом.

Получен<sup>42</sup> вариант 2-гидроксифенилмонооксигеназы из *Pseudomonas azelaica* HBP1, катализирующий гидроксилирование индола и его гидроксид- и бромпроизводных (фермент дикого типа не катализировал эти реакции). В новом варианте фермента обнаружены две аминокислотные замены, отстоящие друг от друга на 146 остатков. Ферменты, окисляющие индол и его производные, могут также использоваться в биотехнологических процессах получения индигонидных красителей и других продуктов органического синтеза.

Проводятся исследования по созданию микроорганизмов, способных к биodeградации галогенпроизводных органических соединений, являющихся отходами химических производств и основой многих пестицидов, остатки которых трудно подвергаются разрушению природными популяциями микроорганизмов в почвах и водах. Удалось существенно повысить активность ключевого фермента деградации 1,2,3-трихлорпропана — галоалкандегалогеназы из *Rhodococcus sp.* (m15-3) методом «перетасовки» ДНК.<sup>43</sup> 1,2,3-Трихлорпропан высокотоксичен, в природе не встречается, а имеет антропогенное происхождение. Модифицированный ген ввели в бактерию (*Agrobacterium radiobacter* AD1), утилизирующую продукт воздействия этого фермента — 2,3-дихлорпропан-1-ол. Полученный штамм оказался способен расти на трихлорпропане как единственном источнике углерода и энергии, что и позволяет использовать его в качестве агента биоремедиации.

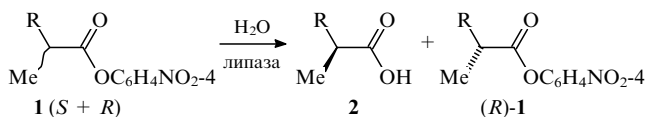
## VI. Стереоселективность и энантиоселективность

Производство энантиомерно чистых соединений приобретает все большее значение для химической и фармацевтической промышленности. В 2000 г. объем продаж оптически

активных лекарственных средств в мире превзошел 100 млрд долл. США. Потребность в таких продуктах обусловлена тем, что молекулы эффективных лекарственных препаратов должны соответствовать асимметрии рецепторов. Например, в США Агентство по пищевым продуктам и лекарственным средствам требует четкого определения, возможно ли производство нового лекарственного вещества в виде оптически чистого изомера.

Один из путей решения этой задачи состоит в использовании ферментов в стереоспецифичных реакциях. Однако часто энантиоселективность ферментов оказывается недостаточной, и ее приходится улучшать с использованием приемов молекулярной эволюции. Результаты таких исследований подробно проанализированы в обзоре<sup>44</sup>.

В работе<sup>45</sup> предложен подход к созданию энантиоселективных катализаторов на основе управляемой эволюции *in vitro*. В качестве тест-реакции был выбран гидролиз рацемического *n*-нитрофенил-2-метилдеcanoата (**1**). Свободная (*S*)-кислота **2** (продукт гидролиза (*S*)-энантиомера эфира **1**) принадлежит к классу соединений, среди которых имеются лекарственные вещества, средства защиты растений и полупродукты для органического синтеза. В качестве катализатора использовали липазу *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, состоящую из 285 аминокислот.



Фермент дикого типа проявляет в этой реакции энантиоселективность лишь 2% в пользу (*S*)-конфигурации. С использованием ПЦР с пониженной точностью ген липазы, состоящий из 933 пар оснований, был подвергнут статистическому мутагенезу. Частоту мутаций варьировали таким образом, чтобы в каждую копию гена липазы вводились в среднем одна или две замены. Это достигалось подбором условий ПЦР (например, изменением концентрации ионов Mg<sup>2+</sup>). Мутированные гены встраивали в экспрессионный вектор, амплифицировали в *E. coli* и вводили в *P. aeruginosa*. За четыре раунда такой селекции энантиоселективность повышалась с 2 до 81%.

Обращением энантиоселективности D-гидантоиназы — ключевого фермента мультиэнзимного пути синтеза метионина — улучшали процесс продукции L-метионина в *E. coli*.<sup>46</sup> Процесс производства L-аминокислот с использованием гидантоиназ (рис. 7) широко используется в промышленности. Для метионина эта реакция предпочтительно идет с D-изомером гидантоина, что приводит к крайне медленному процессу превращения D-изомера *N*-карбамоилметионина в целевой продукт (D-селективная гидантоиназа вызывает накопление D-изомера *N*-карбамоиламинокислоты, которая очень медленно превращается в желаемую аминокислоту).

Через последовательные процедуры ПЦР-мутагенеза и скрининга энантиоселективность D-гидантоиназы была обращена (от *ee*(D) 40% до *ee*(L) 20%), и общая активность повысилась в пять раз. Введение модифицированного гена L-гидантоиназы в рекомбинантный бактериальный штамм с использованием целых клеток в качестве катализатора повысило продуктивность по L-Met и снизило накопление нежелательных промежуточных продуктов по сравнению с клетками дикого типа. Эффект достигается заменой всего лишь одной аминокислоты. Найдены варианты с высокой D-селективностью (*ee*(D) 90%), также содержащие единичную аминокислотную замену. Однако из-за недостатка эффективных методов скрининга проведено мало исследований управляемой эволюции энантиоселективных катализаторов.

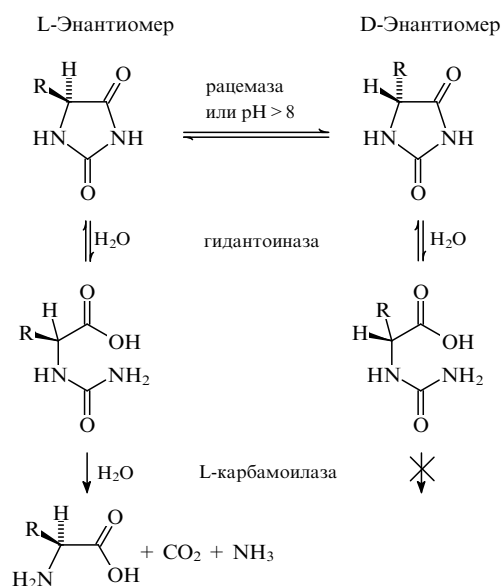


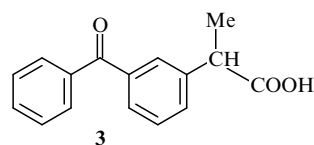
Рис. 7. Ферментативный синтез аминокислот из рацемических 5-замещенных гидантоинов.

В последние годы достигнут значительный прогресс в понимании роли углеводных компонентов в гликозилированных белках, в связи с чем повысился интерес к синтезу различных гликозидных производных белков. Химические методы синтеза в ряду углеводов достаточно сложны, поэтому все более привлекательными становятся ферментативные методы. Наиболее предпочтительны среди ферментов коммерчески выгодные гликозидазы, обладающие помимо гидролазной еще и гликозилтрансферазной активностью. Однако региоселективность таких ферментов часто недостаточна. Попытка модифицировать региоселективность  $\alpha$ -галактозидазы *B. stearothermophilus* предпринята в работе<sup>47</sup>. Фермент дикого типа проявляет специфичность к 1,6-гликозидным связям и в меньшей степени — к 1,3-связям. С использованием статистического мутагенеза и технологии StEP для молекулярной эволюции фермента были получены варианты фермента, преимущественно расщепляющие 1,3-гликозидные связи. У большинства полученных вариантов фермента активность по отношению к 1,6-связям как в гидролизе, так и в трансгликозилировании существенно упала. Получены варианты фермента с соотношением региоспецифичности к связям (1,3):(1,6) = 6.9 против 0.3 для фермента дикого типа. Однако трансгликозилазная активность при этом заметно понижена по сравнению с активностью фермента дикого типа. Авторы считают, что возможность решения поставленной задачи ими продемонстрирована, однако очевидно, что необходимы дальнейшие исследования в этом направлении.

Важным применением стереоселективности ферментов является разделение стерически затрудненных спиртов.<sup>48</sup> Применение ферментов для аналогичных целей практиковалось и ранее, однако в случае стерически затрудненных спиртов положительного результата достигнуть часто не удавалось. Использование липазы *Pseudomonas fluorescens*, метода молекулярной эволюции с применением штамма *E. coli* XL1-Red с высокой частотой спонтанных мутаций позволило получить вариант фермента с повышенной стереоселективностью по отношению к стерически затрудненным сложным эфирам. Однако полностью желаемого результата достигнуть не удалось, так как мутации вносятся в один вариант гена. Большое разнообразие мутантных форм

может быть достигнуто с использованием техники «перетасовки» семейств ДНК.

Эстераза из *Pseudomonas fluorescens* KCTC 1767 применяется для получения оптически чистого кетопрофена (3) из рацемической смеси этиловых эфиров.



Модифицирование ее технологических свойств для повышения термостабильности, сдвига в щелочную область pH-оптимума, повышения устойчивости к некоторым органическим растворителям, неионным детергентам и к высоким концентрациям субстрата проводили<sup>49</sup> за три цикла молекулярной эволюции. Этот пример иллюстрирует возможность с помощью молекулярной эволюции одновременно «улучшать» несколько свойств фермента.

Модифицирование стереоспецифичности ферментов в большинстве случаев связано с модифицированием их субстратной специфичности по отношению к определенному энантиомеру. На примере реакции, катализируемой тагатозо-1,6-дифосфатальдолазой, предложен<sup>50</sup> принципиально другой подход: изменить стереохимию реакции таким образом, чтобы фермент катализировал образование другого продукта из тех же самых исходных субстратов. После шести раундов «перетасовки» ДНК подвергнутая эволюции альдолаза продемонстрировала 80-кратное улучшение соотношения  $k_{\text{кат}}/K_M$  в реакции с неприродным субстратом — фруктозо-1,6-дифосфатом, поскольку фермент переключился на предпочтительное (75%) образование фруктозодифосфата из глицеральдегид-3-фосфата и диоксиацетонфосфата вместо предпочтительного (99%) образования тагатозодифосфата. Следует отметить, что прямая реакция, катализируемая этим ферментом, состоит в расщеплении гексозодифосфатов до триозофосфатов, так что полученные результаты можно отнести к обычной модификации субстратной специфичности. Тем не менее использование фермента в синтезе представляет несомненный интерес.

## VII. Селекция модифицированных вариантов генов

Выше уже отмечалось, что процедура селекции является важнейшим этапом метода управляемой эволюции и индивидуальна для каждого конкретного случая. Существуют, однако, некоторые общие приемы, на основе которых можно создать систему селекции.

Один из них — использование фагового дисплея. Сущность этого подхода заключается в том, что целевой белок экспрессируют в виде рекомбинанта с поверхностным белком бактериофага, который экспонируется на фаговой частице и выводит на ее поверхность целевой белок. Последний при этом оказывается в контакте с раствором и может проявлять ферментативную активность или представлять антигенами антигенные детерминанты целевого белка.

Примером использования такого подхода может служить попытка превратить ДНК-полимеразу (фрагмент Штоффеля ДНК-полимеразы I *Thermus aquaticus*) в РНК-полимеразу.<sup>51</sup> Для этого был осуществлен мутагенез функциональных фрагментов (участков связывания ионов металлов, полинуклеотидного дуплекса, субстрата, взаимодействия с матрицей) по отдельности, затем проведена сборка полноразмерного гена с помощью полимеразы (два раунда ПЦР), а для селекции использовали метод фагового дисплея. В результате была получена эффективная РНК-

полимераза, сохранившая ДНК-полимеразную активность и обладающая достаточной процессивностью.

## VIII. Другие методы рекомбинации ДНК

Разработанные за последнее десятилетие методы управляемой молекулярной эволюции ферментов оказались весьма эффективными. В то же время продолжается накопление данных о структурной организации молекул ферментов, что позволяет использовать при создании и совершенствовании биокатализаторов и рациональные подходы к модифицированию структуры белков. В ряде случаев оказывается полезным сочетание обоих направлений.

Продемонстрирована<sup>52</sup> возможность повышения термостабильности люциферазы светлячков. Фермент используется в качестве аналитического реагента в медицине и при контроле качества пищевых продуктов (в частности, для выявления некоторых микроорганизмов). Он присоединяется к антителам (специфическим к определенным антигенам), и по индукции или подавлению флуоресценции судят о наличии или отсутствии структуры, содержащей этот антиген. Недостаточная термостабильность фермента дикого типа ограничивает его применение, этим и вызваны попытки ее повышения.

Методы молекулярной эволюции применяли<sup>53</sup> для повышения термостабильности фитазы — фермента, расщепляющего фитиновую кислоту (инозитгексафосфат), которая является основной формой хранения фосфора у растений. Этот фермент, широко распространенный среди микроорганизмов и у растительных сельскохозяйственных животных, отсутствует в желудочно-кишечном тракте свиней и птиц. Добавление в корм неорганического фосфата нерентабельно. Для повышения эффективности усвоения растительного корма в него вводят таблетированную форму фитазы, что требует повышения ее природной термостабильности. Ген фермента подвергали сайт-направленному и кассетному мутагенезу с целью замены  $\alpha$ -спирального фрагмента фермента из *Aspergillus terreus* на аналогичный фрагмент фермента *Aspergillus niger*,<sup>53</sup> который обеспечивал более высокую термостабильность гибридного варианта.

## IX. Рациональные подходы к модифицированию ферментов

Рациональные подходы к повышению термостабильности ферментов заключаются или в сравнении аминокислотных последовательностей целевого и более термостабильного родственного белков, или в детальном анализе трехмерной структуры целевого белка с предсказанием перспективных замен аминокислотных остатков на основании как структурных данных, так и принятых концепций конструирования термостабильности; при этом должна проводиться проверка предсказаний путем введения единичных мутаций в последовательность белка дикого типа.

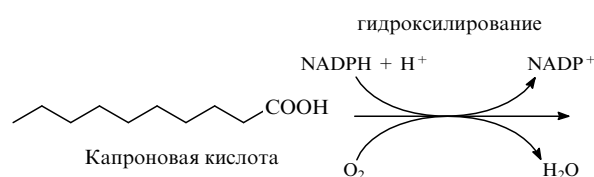
Современные концепции термостабилизации включают, помимо прочего, введение дополнительных дисульфидных мостиков, улучшение укладки гидрофобного ядра, создание сети поверхностных солевых мостиков или дипольных взаимодействий в  $\alpha$ -спирали, изменение в склонности к образованию  $\alpha$ -спирали и изменения энтропии (например, замены  $X \rightarrow Pro$  или  $Gly \rightarrow Ala$ ). Все рациональные подходы такого рода были использованы ранее, однако предсказания не всегда успешны. Причина в том, что замена аминокислотного остатка может иметь не только локальный эффект, но и вызывать непредсказуемые конформационные изменения в разных (в том числе и удаленных) частях молекулы. Тем не менее известны примеры, когда с помощью рациональных подходов удалось достигнуть положительных результатов.

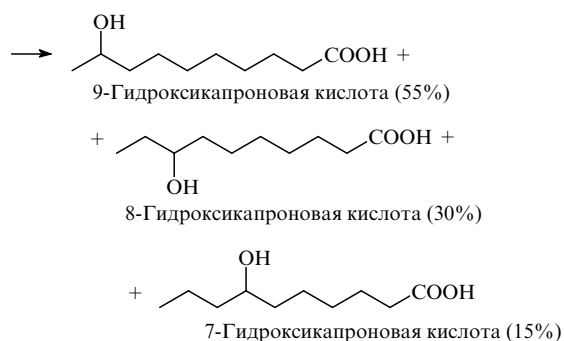
Так, с использованием сайт-направленного мутагенеза были исследованы<sup>54</sup> вклады всех 17 аминокислотных остатков, различающихся у барназы и биназы (бактериальных нуклеаз с 85%-ной аминокислотной гомологией), в термостабильность белка. Влияние одной аминокислотной замены на энергию активации реакции денатурации менялось в диапазоне от +1.1 до  $-1.1$  ккал·моль<sup>-1</sup>. Множественный мутант, включающий шесть аминокислотных замен, продемонстрировал повышение стабильности на 3.3 ккал·моль<sup>-1</sup> по сравнению с диким типом. Таким образом, сравнение близкородственных белков предоставляет полезную информацию для повышения их термостабильности.

Данные различных авторов по молекулярной эволюции протеаз систематизированы в обзоре<sup>55</sup>. Сайт-направленный мутагенез использован для конструирования вариантов субтилизина с улучшенной стабильностью при хранении и по отношению к окислителям. Замена чувствительного к окислению Met222 устойчивыми к окислению остатками аланина, серина или глутамин в субтилизине *B. amyloliquefaciens* BPN2 привела к предотвращению инактивации фермента кислородом. Шесть индивидуальных замен аминокислот (Asn218Ser, Gly169Ala, Tyr217Lys, Met50Phe, Gln206Cys и Asn76Asp) в различных положениях третичной структуры субтилизина привели к возрастанию стабильности фермента при повышенных температурах (65°C) и в более щелочной среде (pH 12). В таких денатурирующих условиях скорость инактивации полученного варианта была в 300 раз ниже, чем для фермента дикого типа. Описаны и другие замены аминокислот, приводящие к повышению стабильности фермента.

Рациональный подход при реконструкции ферментов применялся<sup>56</sup> к оксидазе D-аминокислот из дрожжей *Rhodotorula gracilis*, которая используется для удаления боковой цепи цефалоспоринов при получении полусинтетических антибиотиков этого ряда. С использованием данных РСА кристаллического фермента был получен мутантный вариант Met213Arg, способный катализировать окислительное дезаминирование аспарагиновой кислоты (фермент дикого типа не использует в качестве субстратов аспарагиновую и глутаминовую кислоты). При этом снижается активность по отношению к аланину, однако удалось расширить субстратную специфичность фермента. Следует отметить, что оксидаза D-аминокислот из *Rhodotorula gracilis* — наиболее перспективный фермент для промышленного применения благодаря высокой каталитической активности и прочному связыванию кофактора (ФАД).

Осуществлено<sup>57</sup> модифицирование специфичности цитохрома P450 BM-3 *Bacillus megaterium* с целью придания ему способности катализировать гидроксирование по предконцевым звеньям углеводородного радикала жирных кислот с короткой углеводородной цепью (менее C<sub>12</sub>). Рациональный подход основывался на данных о кристаллической структуре фермента (РСА). Однако выбор замены в данном случае определялся включением в последовательность соответствующих праймеров для ПЦР триплетов случайной последовательности в позициях, где была запланирована замена. В итоге полученные варианты катализировали окисление капроновой кислоты, которую фермент дикого типа гидроксировать не способен.





В дальнейшем было проведено<sup>58</sup> модифицирование цитохрома, которое сделало его способным окислять полициклические ароматические углеводороды (нафталин, флуорен, аценафтен и др.). Для придания ферменту этих свойств оказалось достаточным модифицировать те же аминокислотные остатки, что и в случае окисления алифатических жирных кислот, хотя замены различались. Цель была достигнута в тройном мутанте, причем вместо замены Leu188Lys оптимальной оказалась замена Leu188Gln.

Предложена<sup>16</sup> концепция повышения термостабильности ферментов, основанная не только на сравнении аминокислотных последовательностей гомологичных ферментов из различных источников, но и на построении последовательности-консенсуса из наиболее часто встречающихся в сравниваемых последовательностях аминокислот. Такая аминокислотная последовательность транспонируется в нуклеотидную с учетом частоты использования кодонов (на примере библиотеки аминокислотных последовательностей фитаз). Далее методом полимеразной сборки ген, соответствующий последовательности-консенсусу, синтезируется, клонируется и экспрессируется. Уже первый вариант был значительно стабильнее всех родительских белков. Несколько таких раундов с включением в сравнение последовательностей дополнительных генов из новых источников привели к получению варианта фермента с температурой денатурации 88.5°C, что на 8°C выше, чем у исходного фермента *Aspergillus fumigatus*. Активность консенсусного фермента была выше родительских вариантов во всем диапазоне значений pH. Была проведена оценка вклада каждой из аминокислотных замен. Впоследствии удалось повысить температуру денатурации консенсусной фитазы еще на 2°C.

Большинство бактериальных фитаз имеет pH-оптимум в нейтральной области, в то время как в желудочно-кишечном тракте животных среда слабкокислая. В связи с этим на основе консенсусной фитазы путем сайт-направленного мутагенеза с заменой аминокислотных остатков, влияющих на pH-оптимум фермента, были получены<sup>59,60</sup> варианты фермента с pH-оптимумом, сдвинутым в область более низких значений pH.

Модифицирование форматдегидрогеназ путем точечных замен аминокислотных остатков описано в работах<sup>61,62</sup>. Форматдегидрогеназа — эффективный компонент систем при регенерации кофактора NAD<sup>+</sup>, она используется в ферментативном синтезе многих фармацевтических препаратов. Повышение термостабильности фермента за счет усиления гидрофобного характера  $\alpha$ -спиральных фрагментов вызывалось заменой остатков серина в позициях 131, 160, 184 и 228 на остатки аланина методом сайт-направленного мутагенеза.<sup>61</sup> Интересно, что эффект множественных замен аддитивен, несмотря на достаточную удаленность этих остатков в цепи белка. Вариант фермента, способный к регенерации NADP<sup>+</sup>, был получен<sup>62</sup> на основе данных компьютерного анализа структуры заменой двух соседних аминокислотных остатков в форматдегидрогеназе из пекарских дрожжей: Asp196Ala и Tyr197Arg. Отношение каталитических эффек-

тивностей ( $k_{\text{кат}}/K_M$ ) для NADP и NAD у полученного варианта возросло почти на 10 порядков. Такая замена кофактора повышает коммерческую привлекательность фермента, поскольку именно NADP служит кофактором многих дегидрогеназ, используемых в синтезе и биотрансформации ценных хиральных биологически активных соединений. Полученный результат можно считать значительным, несмотря на то что после введения замен существенно возросла  $K_M$  фермента по формату по сравнению с исходным вариантом. Этот факт лишний раз подтверждает недостаточность данных PCA о структуре глобулы фермента для точного предсказания роли аминокислотных остатков в его функциях.

## Х. Заключение

Управляемая эволюция ферментов в последнее время стала ключевой технологией создания ферментов с новыми и улучшенными свойствами, которые особенно важны для их промышленного использования. Этот подход предоставил методологическую основу для разработки ферментов с новыми свойствами, не требующую обязательных знаний о структуре и механизме их каталитического действия.

При выборе техники решения конкретной задачи следует, однако, иметь в виду, что при всей универсальности разные методы управляемой эволюции различаются по результатам. В частности, техника ступенчатого укорочения генов ферментов с негомологичной рекомбинацией позволяет осуществлять модифицирование внутренних областей фермента, в то время как техника наращивания цепи со «случайным блужданием» приводит к получению гибридов, имеющих больше гомологий в N-концевой части гена. Рекомбинация со случайными праймерами дает практически равномерное распределение случайных замен по всей молекуле фермента.

Число вариантов для селекции ферментов с «улучшенными» свойствами велико при любых методах молекулярной эволюции. В связи с этим предлагаются различные варианты оптимизации условий получения библиотек генов, включая компьютерные. Недавно предложен<sup>63</sup> один из таких подходов, основанный на учете термодинамических и кинетических параметров «перетасовки» ДНК и проведено сравнение предсказания с результатами.

В ряде ситуаций возникает необходимость защитить какую-либо критическую для функций белка аминокислоту от участия в мутационных событиях. Для этого предлагается<sup>64</sup> процедура, основанная на введении в кодон такой аминокислоты олигонуклеотидного фрагмента, содержащего сайт расщепления какой-либо рестриктазы. После проведения «перетасовки» ДНК этот олигонуклеотид выщепляется рестриктазой и проводится лигирование. Если в кодоне произошли мутационные события, комплементарность выступающих концов сайта рестрикции нарушается, лигирование не происходит, и такие клоны исключаются из последующей селекции.

Методы молекулярной эволюции можно использовать не только для «улучшения» свойств отдельных ферментов, но и для решения задач более широкого масштаба, например для конструирования генетических регуляторных систем.<sup>65,66</sup> Это позволяет осуществлять тонкую настройку биохимических параметров метаболической схемы экспериментальным путем *in vivo*. Применяв технологию управляемой эволюции к генам, составляющим простую генетическую схему, авторы показали, что нефункционирующая из-за неправильного подбора компонентов схема быстро эволюционирует в функциональную схему. Создана библиотека генетических инструментов с различным поведением, кото-

рые можно использовать для построения более сложных схем.

Приемы управляемой молекулярной эволюции можно также успешно применять в конструировании «нуклеозимов» — каталитически активных нуклеиновых кислот. Самофосфорилирующуюся ДНК сконструировали и выделили из пула случайных мутантных последовательностей ДНК как вариант, способный фосфорилировать собственный 5'-конец.<sup>67</sup> За шесть раундов селекции получили «нуклеозим», эффективно фосфорилирующий как РНК, так и ДНК.

Основные сложности управляемой эволюции связаны с созданием эффективной системы селекции вариантов, обладающих улучшенными по сравнению с исходным материалом свойствами. Эта задача в основном решается за счет искусства исследователя. Тем не менее представленные в обзоре материалы показывают исключительно высокий потенциал молекулярной эволюции в конструировании биокатализаторов.

Обзор подготовлен при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты № 01-05-64615 и 04-05-64188).

## Литература

1. M.Ostermeier, A.E.Nixon, J.H.Shim, S.J.Benkovic. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 3562 (1999)
2. M.Ostermeier, J.H.Shim, S.J.Benkovic. *Nat. Biotechnol.*, **17**, 1205 (1999)
3. S.Lutz, M.Ostermeier, S.J.Benkovic. *Nucleic Acids Res.*, **29**, e16 (2001)
4. W.P.C.Stemmer. *Nature (London)*, **370**, 389 (1994)
5. W.P.C.Stemmer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 10747 (1994)
6. H.Zhao, F.H.Arnold. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 1307 (1997)
7. F.C.Christians, L.Scappozza, A.Cramer, G.Folkers, W.P.C.Stemmer. *Nat. Biotechnol.*, **17**, 259 (1999)
8. J.E.Ness, M.Welch, L.Giver, M.Bueno, J.R.Cherry, T.V.Borchert, W.P.C.Stemmer, J.Minshull. *Nat. Biotechnol.*, **17**, 893 (1999)
9. L.Giver, A.Gershenson, P.-O.Freskgard, F.H.Arnold. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 12809 (1998)
10. I.P.Petrounia, F.H.Arnold. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **11**, 325 (2000)
11. M.Kikuchi, K.Ohnishi, S.Harayama. *Gene*, **236**, 159 (1999)
12. M.D.Gibbs, K.M.H.Nevalainen, P.L.Bergquist. *Gene*, **271**, 13 (2001)
13. A.A.Volkov, Zh.Shao, F.H.Arnold. *Nucleic Acids Res.*, **27**, e18 (1999)
14. H.Zhao, L.Giver, Z.Shao, J.A.Affholder, F.H.Arnold. *Nat. Biotechnol.*, **16**, 258 (1998)
15. Z.Shao, H.Zhao, L.Giver, F.H.Arnold. *Nucleic Acids Res.*, **8**, 681 (1998)
16. M.Lehmann, L.Pasamontes, S.F.Lassen, M.Wyss. *Biochim. Biophys. Acta*, **1543**, 408 (2000)
17. C.Vieille, G.J.Zeikus. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **65**, 1 (2001)
18. P.L.Wintrobe, K.Miyazaki, F.H.Arnold. *Biochim. Biophys. Acta*, **1549**, 1 (2001)
19. A.Merz, M.-C.Yee, H.Szadkovski, G.Pappenberger, A.Cramer, W.P.C.Stemmer, Ch.Yanofsky, K.Kirschner. *Biochemistry*, **39**, 880 (2000)
20. A.Lönn, M.Gárdonyi, W.van Zyl, B.Hahn-Hägerdal, R.C.Otero. *Eur. J. Biochem.*, **89**, 116 (2002)
21. R.Sakaue, N.Kajiyama. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 139 (2003)
22. H.Komeda, N.Ishikawa, Y.Asano. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, **21**, 283 (2003)
23. K.Chen, F.H.Arnold. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 5618 (1993)
24. L.You, F.H.Arnold. *Protein Eng.*, **9**, 77 (1996)
25. H.Zhao, F.H.Arnold. *Protein Eng.*, **12**, 47 (1999)
26. S.-H.Baik, T.Ide, H.Yoshida, O.Kagami, S.Harayama. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **61**, 329 (2003)
27. K.L.Maxwell, A.K.Mittermaier, J.D.Forman-Kay, A.R.Davidson. *Protein Sci.*, **8**, 1908 (1999)
28. G.S.Waldo, B.M.Standish, J.Berendzen, T.C.Terwilliger. *Nat. Biotechnol.*, **17**, 691 (1999)
29. J.K.Yang, M.S.Park, G.S.Waldo, S.W.Suh. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 455 (2003)
30. Y.Zhang, Z.Zhao, F.Li, Ch.Cao, Ch.Liu, Q.Ma. *Biotechnol. Lett.*, **22**, 947 (2000)
31. I.Matsumura, J.B.Wallingford, N.K.Surana, P.D.Vize, A.D.Ellington. *Nat. Biotechnol.*, **17**, 696 (1999)
32. T.Bulter, M.Alcalde, V.Sieber, P.Meinholt, Ch.Schlachtbauer, F.H.Arnold. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 987 (2003)
33. J.-H.Zhang, G.Dawes, W.P.C.Stemmer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 4504 (1997)
34. D.Sriprapundh, C.Vieille, J.G.Zeikus. *Protein Eng.*, **16**, 683 (2003)
35. T.Yano, Sh.Oue, H.Kagamiyama. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 5511 (1998)
36. L.G.Otten, Ch.F.Sio, J.Vrielink, R.H.Cool, W.J.Quax. *J. Biol. Chem.*, **277**, 42121 (2002)
37. Ch.F.Sio, A.M.Riemens, J.-M.van der Laan, R.M.D.Verhaert, W.J.Quax. *Eur. J. Biochem.*, **269**, 4495 (2002)
38. Ch.-W.Wang, J.C.Liao. *J. Biol. Chem.*, **276**, 41161 (2001)
39. D.Umeno, F.H.Arnold. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 3163 (2003)
40. D.Umeno, A.V.Tobias, F.H.Arnold. *J. Bacteriol.*, **184**, 6690 (2002)
41. H.Suenaga, M.Goto, K.Furukawa. *J. Biol. Chem.*, **276**, 22500 (2001)
42. A.Meyer, M.Würsten, A.Schmid, H.-P.E.Kohler, B.Witholt. *J. Biol. Chem.*, **277**, 34161 (2002)
43. T.Bosma, J.Dambrowský, G.Stucki, D.B.Janssen. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 3582 (2002)
44. K.-E.Jaeger, T.Eggert, A.Eipper, M.T.Reetz. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **55**, 519 (2001)
45. M.T.Reetz, A.Zonta, K.Scimossek, K.Liebeton, K.-E.Jaeger. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **36**, 2830 (1997)
46. O.May, P.T.Nguyen, F.H.Arnold. *Nat. Biotechnol.*, **18**, 317 (2000)
47. M.Dion, A.Nisole, P.Spangenberg, C.André, A.Glottin-Fleury, R.Matte, Ch.Tellier, C.Rabiller. *Glycoconjugate J.*, **18**, 215 (2001)
48. U.T.Bornscheuer, J.Altenbuchner, H.H.Meyer. *Bioorg. Med. Chem.*, **7**, 2169 (1999)
49. J.H.Kim, G.-S.Choi, S.-B.Kim, W.-H.Kim, J.-Y.Lee, Y.-W.Ryu, G.-J.Kim. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, **27**, 169 (2004)
50. G.J.Williams, S.Domann, A.Nelson. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 3145 (2003)
51. G.Xia, L.Chen, M.Fa, P.G.Schultz, F.E.Romesberg. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 6597 (2002)
52. L.C.Tisi, P.J.White, D.J.Squirelli, M.J.Murphy, C.R.Lowe, J.A.H.Murray. *Anal. Chim. Acta*, **416**, 115 (2002)
53. L.Jermutus, M.Tessier, L.Pasamontes, A.P.G.M.van Loon, M.Lehmann. *J. Biotechnol.*, **85**, 15 (2001)
54. L.Serrano, A.G.Day, A.R.Fersht. *J. Mol. Biol.*, **233**, 305 (1993)
55. R.Gupta, Q.K.Beg, P.Lorenz. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **59**, 15 (2002)
56. S.Sacchi, S.Lorenzi, G.Molla, M.S.Pilone, C.Rossetti, L.Pollegioni. *J. Biol. Chem.*, **277**, 27510 (2002)
57. O.Lentz, Q.-Sh.Li, U.Schwaneberg, S.Lutz-Wahl, P.Fischer, R.D.Schmid. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, **15**, 123 (2001)
58. Q.-Sh.Li, J.Ogawa, R.D.Schmid, S.Shimizu. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 1635 (2001)
59. M.Lehmann, C.Loch, A.Middendorf, D.Studer, S.F.Lassen, L.Pasamontes, A.P.G.M.van Loon, M.Wyss. *Protein Eng.*, **15**, 403 (2002)
60. A.Tomschy, R.Brugger, M.Lehmann, A.Svendsen, K.Vogel, D.Kostrewa, S.F.Lassen, D.Burger, A.Kronenberger, A.P.G.M.van Loon, L.Pasamontes, M.Wyss. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 1907 (2002)
61. A.M.Rojkova, A.G.Galkin, L.B.Kulakova, A.E.Serov, P.A.Savitsky, V.V.Fedorchuk, V.I.Tishkov. *FEBS Lett.*, **445**, 183 (1999)
62. A.E.Serov, A.S.Popova, V.V.Fedorchuk, V.I.Tishkov. *Biochem J.*, **367**, 841 (2002)
63. N.Maheshri, D.Schaffer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 3071 (2003)

64. D.Umeno, K.Hiraga, F.H.Arnold. *Nucleic Acids Res.*, **31**, e91 (2003)
65. Y.Yokobayashi, R.Weiss, F.H.Arnold. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 16587 (2002)
66. Y.Yokobayashi, C.H.Collins, J.R.Leadbetter, R.Weiss, F.H.Arnold. *Adv. Complex Syst.*, **6**, 37 (2003)
67. Y.Li, R.R.Breaker. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 2746 (1999)

## CONTROLLED EVOLUTION AS AN APPROACH TO THE DESIGN OF EFFICIENT BIOCATALYSTS

**S.N.Zagrebelsky**

*Novosibirsk State University*

*2, Ul. Pirogova, 630090 Novosibirsk, Russian Federation, Fax +7(383)239–7101*

Methodical approaches to modification of the catalytic properties of enzymes by controlled-evolution means are generalised. A number of particular examples of the design of enzymes with new and enhanced properties, including higher thermal stability, solubility, substrate specificity, stereoselectivity, *etc.*, are considered. The prospects for further development of the controlled evolution strategy for enzymes and proteins with other functions are discussed.

Bibliography — 67 references.

*Received 16th January 2004*