

УДК 577.15.02

ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА МУТАНТНЫХ ФОРМ ПЕРОКСИДАЗЫ ТАБАКА С ДОПОЛНИТЕЛЬНЫМ ОСТАТКОМ ТРИПТОФАНА

А.А. Полозников, П.А. Савицкий, Д.М. Хушпулян, Т.А. Чубарь, И.Г. Газарян, В.И. Тишков

(кафедра химической энзимологии; e-mail: vit@enz.chem.msu.ru)

Методом полимеразной цепной реакции получены мутантные формы пероксидазы табака (ТОР) Gln116Trp и Leu157Trp. Экспрессия этих мутантов была осуществлена путем клонирования в вектор pET40b и культивированием в штамме *E. coli* BL21(DE3) Codon Plus. Уровень экспрессии апобелка пероксидазы табака в выбранном штамме в обоих случаях составил более 40% общего белка. Процедура рефолдинга мутантных форм была проведена на основе известной методики рефолдинга рекомбинантной пероксидазы табака дикого типа. Выход реактивации мутантных форм пероксидазы табака составляет 3–9%, удельная активность по АБТС – 2000–3000 ед. активности на 1 мг белка. Изучены зависимости скорости окисления АБТС перекисью водорода от концентрации субстратов. Показано, что данная реакция, катализируемая мутантными формами, протекает по механизму типа “пинг-понг”, однако удельная активность по различным субстратам у Gln116Trp и Leu157Trp существенно различается. Таким образом, можно сделать предположение, что остатки триптофана выступают в роли элемента в цепи передачи заряда между активным центром фермента и субстратом.

Изучение природной пероксидазы табака (ТОР), выделенной и охарактеризованной в нашей лаборатории [1], показало, что этот фермент имеет ряд необычных свойств. Во-первых, это более высокая стабильность как при хранении фермента в растворе, так и во время реакции. Этот эффект особенно заметен при максимальных и минимальных значениях рН в присутствии ионов кальция. Высокая стабильность ТОР в широком диапазоне рН позволила детектировать активность этого фермента в реакции окисления вератрового спирта при значениях рН раствора <2 [2], что совершенно невозможно, например, в случае пероксидазы из корней хрена. Фермент стабилен также и при химической модификации в щелочной среде, что позволяет получать более активные конъюгаты ТОР с антителами, чем при использовании пероксидазы хрена [3, 4]. Во-вторых, этот фермент имеет другой профиль субстратной специфичности по сравнению с пероксидазами из других источников. Например, в отличие от пероксидазы хрена для ТОР характерны практически полное отсутствие активности по отношению к иодиду и фенолу и исключительно высокая активность по отношению к люминолу даже в отсутствие различных усилителей реакции хемиллюминесценции, что делает фермент перспективным для целей хемиллюминесцентного анализа [5]. В-третьих, свойства про-

межуточных соединений пероксидазы табака (высокая стабильность соединения I и неустойчивость соединения II при кислых значениях рН) очень схожи со свойствами промежуточных соединений грибной пероксидазы *Coprinus cinereus* (*Arthromyces ramosus*), запатентованной в качестве хемиллюминесцентного реагента [6]. В-четвертых, наши исследования показали, что эффективность прямого электронного переноса (ПЭП) между активным центром фермента и поверхностью электрона у нативной ПТ на 20% выше, чем у нативной ПХ [7, 8]. Эффективность прямого электронного переноса сильно зависит от расстояния между активным центром фермента и поверхностью электрода. В силу статистического характера иммобилизации не все молекулы фермента ориентированы своим активным центром в сторону поверхности электрода. Поэтому число молекул пероксидазы, участвующих в ПЭП, будет всегда меньше общего числа молекул фермента, находящихся на поверхности электрода [9]. Ранее на примере лигнинпероксидазы было показано, что в передаче электронов между активным центром и субстратом в белковой молекуле могут быть задействованы остатки триптофана [10].

Таким образом, была поставлена задача получения мутантных форм рекомбинантной пероксидазы табака, содержащей дополнительные остатки трип-

тофана. Анализ компьютерной модели пероксидазы табака, созданной методом гомологичного моделирования, позволил выбрать возможные места замены на триптофан. Данная статья представляет результаты наших исследований по экспрессии двух новых мутантных форм TOP Gln116Trp и Leu157Trp, их рефолдинга и измерения кинетических характеристик.

Экспериментальная часть

Мутантные формы пероксидазы табака получали с помощью полимеразной цепной реакции Gln116Trp и Leu157Trp. Для экспрессии в клетках *E. coli* гены мутантных TOP и фермента дикого типа были переклонированы в экспрессионный вектор pET40b. Полученные плазмиды были использованы для трансформации штамма – продуцента *E. coli* BL21(DE3) Codon Plus, в котором tPHK редких для *E. coli* кодонов AGA, AGG и CCC синтезируется в больших количествах.

Единичную колонию трансформированных клеток *E. coli* BL21(DE3) Codon Plus культивировали в пробирке, содержащей 3 мл среды 2YT (16 г/л бактотриптона, 10 г/л дрожжевого экстракта и 5 г/л хлорида натрия, pH 7,0), в присутствии 40 мкг/мл канамицина и 25 мкг/мл хлорамфеникола в течение ночи при 31°C и 180 об/мин. Затем отбирали 1 мл культуральной жидкости и помещали в 200 мл той же среды, находящейся в качалочной колбе объемом 1 л. Культивирование проводили при 31°C и 100 об/мин. Клетки дорастивали до начала логарифмической фазы и затем индуцировали экспрессию гена TOP или ее мутантов добавлением в среду ИПТГ до конечной концентрации 0,2 мМ. Затем температуру понижали до 27°C и культивировали клетки в течение 6 ч. Биомассу собирали центрифугированием при 5000 g, клетки ресуспендировали в 2 М растворе NaCl, содержащем 10 мМ дитиотреитола (ДТТ), и разрушали ультразвуком в течение 10 мин при 22 кГц. Смесь после разрушения оставляли на 1,5 ч при комнатной температуре и затем повторяли обработку ультразвуком. Надосадочную жидкость удаляли, осадок промывали 10 мл 0,05 М буфера Трис-НСl, pH 8,5 и солюбилизировали в 10 мл 6 М мочевины, содержащей 1 мМ ДТТ. Солюбилизованный апобелок (95% чистоты) приливали по каплям к среде для рефолдинга (100 мл) и инкубировали при 4°C. Среда для рефолдинга содержала оптимизированные для TOP дикого типа концентрации мочевины (1,8 М), окисленного глутатиона (0,5 мМ),

ДТТ (0,1 мМ), а также 1 мМ CaCl₂, 5 мкМ гемина, 5% глицерина в 50 мМ буфере Трис-НСl (pH 9,5). В процессе инкубации измеряли активность по АБТС. После прекращения роста активности проводили увеличение концентрации раствора фермента (в 30 раз) на ячейке *Amicon* объемом 50 мл через мембрану YM-10. Полученный концентрированный раствор наносили порциями по 3 мл на колонку (2,6490 см) с Sephacryl S 200, уравновешенным 50 мМ буфером Трис-НСl, pH 8,5. Повторную гель-фильтрацию проводили на колонке (2,6460 см) с *Toyopearl HW 55*, уравновешенным тем же буфером. Фракции, содержащие активный фермент, объединяли и концентрировали. Содержание белка определяли спектрофотометрически, по формуле

$$c \text{ (мкг/мл)} = 183 A_{230} - 75,8 A_{260} [8],$$

которая, как было предварительно показано, дает те же результаты, что и метод Лоури и др. [9]. Чистоту полученных препаратов контролировали методом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии DDS-Na.

Измерения активности проводили на спектрофотометре "UV 120-02 Shimadzu" (Япония) при 25°C в 0,1 М натрий-ацетатном буфере (pH 4,5) и концентрациях АБТС и H₂O₂, равных 0,4 и 1 мМ соответственно. Константы скорости в реакции окисления АБТС определяли из данных по стационарной кинетике, варьируя концентрации субстратов в пределах 0,015–0,15 мМ для АБТС, 0,010–0,5 мМ для H₂O₂ в отсутствие и в присутствии 50 мМ CaCl₂ в 0,05 М натрий-ацетатном буфере (pH 4,5). Молярный коэффициент поглощения продукта окисления АБТС при 405 нм был принят равным 36,8 мМ⁻¹см⁻¹ [10]. Концентрацию перекиси водорода определяли спектрофотометрически ($\epsilon_{240} = 43,6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [11].

Результаты и их обсуждение

Культивирование и экспрессия

Экспрессия пероксидазы табака наблюдалась только в штамме *E. coli* BL21(DE3)Codon Plus (рис. 1). После индукции ИПТГ клетки растили 6 ч до плотности 5–7 мг/мл (рис. 2). Оба мутанта, как и фермент дикого типа, синтезировались в виде нерастворимых телец включения. Уровень экспрессии составлял более 40% общего белка (50–60 мг на 1 л культуральной среды) (рис. 1). Количество полученной биомассы и высокий уровень содержания фермента в клетках позволил провести рефолдинг мутантов из телец включения.

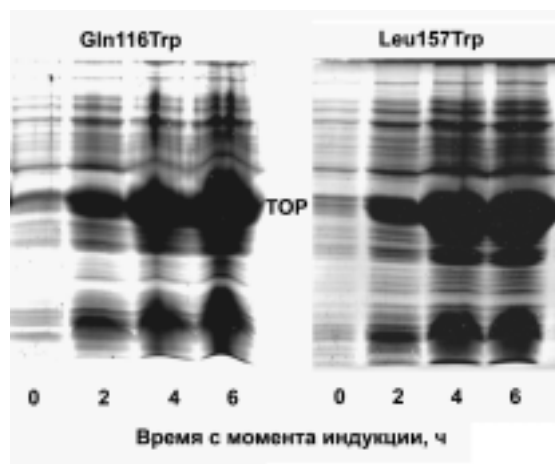


Рис. 1. Экспрессия мутантных ферментов в штамме *E. coli* BL21(DE3)Cd Plus в различные моменты культивирования

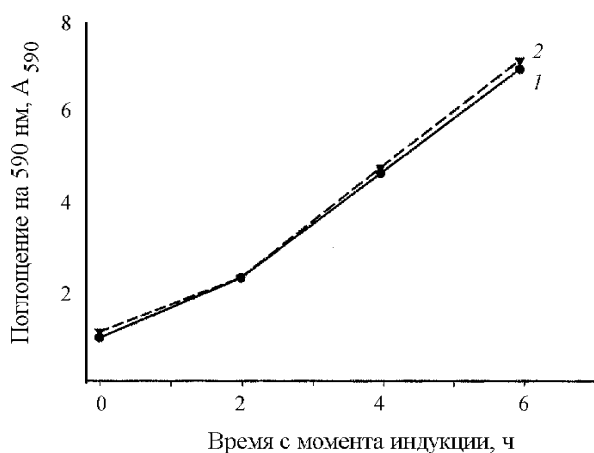


Рис. 2. Кинетика культивирования штаммов-продуцентов: 1 – Gln116Trp, 2 – Leu157Trp

Рефолдинг

Полученную биомассу разрушали с помощью ультразвука. Растворимые белки удаляли центрифугированием. Промывка раствором соли нерастворимых фрагментов клеток после центрифугирования приводила к существенной очистке целевого белка, достаточной для последующего рефолдинга. На рис. 3 представлены зависимости накопления мутантных TOP в активной форме. Поскольку рефолдинг всех форм рекомбинантной пероксидазы табака происходил в одинаковых условиях (по составу среды для рефолдинга и концентрации белка), можно сделать вывод, что выход реактивации обеих мутантных форм одинаков.

Очистка мутантных форм пероксидазы табака

Выделение активного рекомбинантного фермента из среды для рефолдинга и его последующая очистка ультрафильтрацией и гель-фильтрацией продемонстрировали сходство мутантов.

В отличие от рекомбинантной пероксидазы хрена, осаждение сульфатом аммония, которое проводится с целью концентрирования белка и освобождения от неправильно свернутого и агрегированного белка, приводит к значительным потерям активного белка рекомбинантной пероксидазы табака дикого типа (до 70–80% активности), которые можно избежать при использовании ультрафильтрации. В этом случае потеря по суммарной активности на стадии концентрирования не наблюдается (табл. 1, 2). Потери по активности происходят при гель-фильтрации за счет пе-

Таблица 1

Получение и очистка мутантной формы пероксидазы табака Gln116Trp (из 0,2 л культуральной среды)

Стадия очистки	Общий белок, мг	Общая активность, E	Удельная активность, E/мг	Выход по активности, %	Фактор очистки	RZ
Солюбилизация в 6 М мочеvine	11,3	–	0	0	–	–
Реактивация	11,3	2320	207	100	1	0,57
Ультрафильтрация	7,1	2320	327	100	1,6	0,57
Гель-фильтрация	1,9	1300	684	86,1	3,3	0,72
Ультрафильтрация	1,8	1300	722	86,1	3,5	0,72
Гель-фильтрация	0,4	1250	3130	53,9	15,1	1,01

Таблица 2

Получение и очистка мутантной формы пероксидазы табака Leu157Trp (из 0,2 л культуральной среды)

Стадия очистки	Общий белок, мг	Общая активность, E	Удельная активность, E/мг	Выход по активности, %	Фактор очистки	RZ
Солюбилизация в 6 М мочеvine	11,3	–	0	0	–	–
Реактивация	11,3	2420	215	100	1	0,38
Ультрафильтрация	8,4	2420	288	100	1,3	0,38
Гель-фильтрация	1,6	2200	1375	91	6,4	0,89
Ультрафильтрация	1,6	2200	1375	91	6,4	0,89
Гель-фильтрация	1,1	2180	1980	90	9,2	1,09

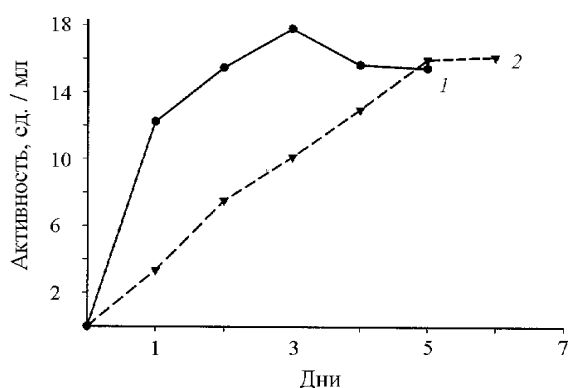


Рис. 3. Рост ферментативной активности рекомбинантных форм пероксидазы табака в процессе рефолдинга: 1 – Gln116Trp, 2 – Leu157Trp (условия рефолдинга одинаковы для всех ферментов, концентрация белка равна 0,1 мг/мл)

рекрывания пиков агрегированного и неагрегированного ферментов, и дополнительные потери по активности (около 30%) происходят при повторной гель-фильтрации. RZ в ходе очистки увеличивается в 2–3 раза, однако не достигает 3 (это значение считается признаком высокоочищенного фермента у классических пероксидаз). У нативной пероксидазы табака, как у большинства известных пероксидаз, в структуре имеется всего один остаток триптофана, поэтому введение хотя бы одного существенно повышает поглощение на длине волны 280 нм.

Кинетические параметры реакции окисления АБТС обоими ферментами

Для механизма типа “пинг-понг”, по которому протекает катализ гем-содержащими пероксидазами, и в

том числе пероксидазой табака, тангенс угла наклона в двойных обратных координатах при любой фиксированной концентрации одного субстрата обратно пропорционален константе скорости по второму субстрату в соответствии с уравнением:

$$1/v = 1/[E]_0 \{ 1/k_u + (1/k_{H_2O_2} [H_2O_2]) + (1/k_s [S]) \},$$

где $[E]_0$ – начальная концентрация фермента, k_u – константа, соответствующая мономолекулярной скорости-лимитирующей стадии, $k_{H_2O_2}$ – константа скорости второго порядка по перекиси водорода, k_s – константа скорости второго порядка по субстрату-донору (в данном случае АБТС).

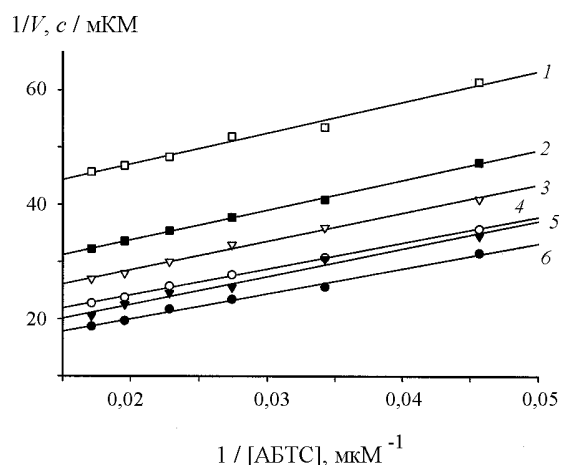


Рис. 4. Зависимость начальной скорости реакции окисления АБТС перекисью водорода под действием пероксидазы табака мутантной формы Gln116Trp в двойных обратных координатах при различных концентрациях перекиси водорода: 1 – 26; 2 – 39; 3 – 52; 4 – 64; 5 – 76; 6 – 88

Т а б л и ц а 3

Кинетические параметры реакции окисления АБТС, катализируемой рекомбинантной пероксидазой табака

ТОР	Константы скорости	
	$k_{\text{H}_2\text{O}_2}$, $\text{M}^{-1}\text{c}^{-1}$	$k_{\text{АБТС}}$, $\text{M}^{-1}\text{c}^{-1}$
Дикого типа	$(3,6 \pm 0,6) \times 10^6$	$(8,2 \pm 0,9) \times 10^6$
Gln116Trp	$(2,9 \pm 0,4) \times 10^6$	$(8,7 \pm 0,7) \times 10^6$
Leu157Trp	$(1,5 \pm 0,4) \times 10^6$	$(6,4 \pm 0,7) \times 10^6$

Из данных, представленных на рис. 4, видно, что окисление АБТС под действием мутантных форм

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект РФФИ а-04-04-48286).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gazaryan I.G., Rubtsova M. Yu., Kapeliuch Yu.L., Rodriguez-Lopez J.N., Lagrimini L.M., and Thorneley R.N.F. // *Photochem. Photobiol.* 1998. **67**. P. 106.
2. Gazaryan I.G., Lagrimini L.M. // *Phytochemistry*. 1996. **41**. P. 1029.
3. Gazarian I.G., Lagrimini L.M., George S.J., Thorneley R.N.F. // *J. Biochem.* 1996. **320**. P. 369.
4. Gazarian I.G., Lagrimini L.M., Ashby G.A., Thorneley R.N.F. // *J. Biochem.* 1996. **313**. P. 841.
5. Gazarian I.G., Lagrimini L.M. // *Biophys. Chem.* 1998. **72**. P. 231.
6. Gazarian I.G., Lagrimini L.M., Mellon F.A., Naldrett M.J., Ashby G.A., Thorneley R.N.F. // *J. Biochem.* 1998. **333**. P. 223.
7. Ruzgas T., Gorton L., Emn us J., Marko-Varga G. // *J. Electroanal. Chem.* 1995. **391**. P. 41.
8. Lindgren A., Munteanu F.-D., Gazaryan I.G., Ruzgas T., Gorton L. // *J. Electroanal. Chem.* 1998. **458**. P. 113.
9. Lindgren A., Tanaka M., Ruzgas T., Gorton L., Gazaryan I.G., Ishimori K., Morishima I. // *Electrochem. Commun.* 1999. **1**. P. 171.
10. Timofeevski S.L., Nie G., Reading N.S., Aust S.D. // *Arch. Biochem. Biophys.* 2000. **373**. P. 147.
11. Welinder K.G. // *Eur. J. Biochem.* 1985. **96**. P. 483.

Поступила в редакцию 01.12.05

PREPARATION AND PROPERTIES OF MUTANT TOBACCO PEROXIDASE WITH ADDITIONAL TRYPTOPHAN RESIDUES

A.A. Poloznikov, P.A. Savitsky, D.M. Khushpulyan, T.A. Chubar, I.G. Gazaryan, V.I. Tishkov

(Division of Chemical Enzymology)

Mutant forms of tobacco peroxidase Gln116Trp and Leu157Trp have been prepared and expressed in *E. coli* cells BL21(DE3) CodonPlus. The mutants were expressed at the level up to 40% of total *E. coli* proteins as inclusion bodies. Both mutants were prepared in inactive form according to standard refolding procedure optimized for wild-type TOP. Yield of active proteins was about 9% and specific activity with ABTS – 2000–3000 U per mg of protein. Kinetic properties of mutant enzymes in reaction of ABTS oxidation with hydrogen peroxide have been studied. It was shown that reaction proceeds through ping-pong kinetic mechanism but rate constants for separate stages were different for mutants. It was supposed that additional tryptophan residues participate in enzyme catalysis.