



УДК 577.152.3.03

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ СТАБИЛИЗАЦИИ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ. МОДЕЛЬ ТЕРМОЛИЗИНПОДОБНЫХ МИКРОБНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ

© 2003 г. И. В. Демидюк[#], М. В. Заболотская, Д. Р. Сафина, С. В. Костров

Институт молекулярной генетики РАН, 123182, Москва, пл. Курчатова, 2

Поступила в редакцию 30.01.2003 г. Принята к печати 25.02.2003 г.

Рассмотрены результаты изучения молекулярных механизмов, обеспечивающих стабильность протеолитических ферментов. Особое внимание уделено автолитическому пути инактивации протеиназ. Наиболее подробно обсуждаются эксперименты, направленные на повышение температурной стабильности термолизинподобных металлопротеиназ.

Ключевые слова: протеолитические ферменты, термостабильность, пространственная структура; термолизинподобные металлопротеиназы.

ВВЕДЕНИЕ

Молекулярные механизмы, обеспечивающие стабильность белков, привлекают к себе пристальное внимание исследователей. Однако, несмотря на длительное и интенсивное изучение, данная проблема весьма далека от разрешения. Это, по-видимому, в первую очередь связано с недостаточной разработанностью теоретических подходов, которые можно было бы использовать для детального анализа такого фундаментального процесса, как самопроизвольное, но строго детерминированное формирование и стабилизация пространственных структур. Многочисленные эмпирические исследования также не привели к выявлению закономерностей или формулировке достаточно общих правил, описывающих фолдинг и стабилизацию белковых молекул. Работы, связанные с попытками увеличения стабильности белков, позволили лишь сформулировать ряд «советов белковому инженеру», основанных на сопоставлении результатов, полученных на различных экспериментальных моделях [1]. Однако эти рекомендации отнюдь не универсальны, а обоснование определяющих их механизмов далеко не бесспорно. Вопрос о том, существуют ли вообще более или менее универсальные механизмы, определяющие стабильность белков различных групп, или же стабилизация молекул каждого конкретного фермента (или эволюционной группы ферментов) осуществляется уникальным и, следовательно, случайно реализованным эволюцией способом, остается открытым. Последнее соображение ставит под сомнение возможность переноса накопленной информации о способах стабилиза-

ции молекул при переходе от одной экспериментальной системы на другую.

Выделяют две основные составляющие, влияющие на изменение свободной энергии молекулы при формировании пространственной структуры – энтропийную и энтальпийную. При этом существующие оценки показывают, что, хотя энтропийная и энтальпийная составляющие изменяются в ходе этого процесса на сотни ккал/моль, тем не менее, суммарная разница в уровнях свободной энергии между нативной и неупорядоченной формами молекул (энергия стабилизации) для подавляющего большинства охарактеризованных белков составляет всего 5–15 ккал/моль [2]. Разница в энергии стабилизации между родственными белками из мезо- и термофильных организмов имеет величину 5–7 ккал/моль [2–4]. Для сравнения, энергия водородной связи равна 2–5 ккал/моль. Было предположено, что столь низкая энергия стабилизации имеет существенный биологический смысл, обеспечивая, с одной стороны, конформационную подвижность белковых молекул, необходимую для их функционирования, а с другой стороны – предусматривая возможность их деградации за счет образования локально денатурированных форм, чувствительных к атаке протеолитическими ферментами. Однако, по-видимому, не следует думать, что интегральная стабильность белковой молекулы или разница в термостабильности между термофильными и мезофильными белками целиком обеспечивается двумя-тремя конкретными взаимодействиями.

В большинстве современных исследований процесс денатурации белковых молекул, естественно со значительным упрощением, рассматривается как двухстадийный. Первая стадия представляет собой кинетическое равновесие между

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 196-18-53; факс: (095) 196-02-21; эл. почта: duk@img.ras.ru).

нативной и частично денатурированной формами молекулы, а вторая – необратимый переход к денатурированной форме. Таким образом, весь процесс в целом может быть описан уравнением $N \longleftrightarrow ЧД \longrightarrow Д$, где N – нативная форма, $ЧД$ – частично денатурированная, а $Д$ – денатурированная. Стабилизация белковых молекул может быть достигнута следующими основными подходами: увеличением стабилизирующих и уменьшением дестабилизирующих взаимодействий в нативной форме молекулы, а также уменьшением энтропии частично денатурированной формы. Последний подход получил название энтропийной стабилизации [1] и на практике означает уменьшение числа возможных конформаций частично денатурированной формы, что сдвигает равновесие в сторону нативной конформации. Как правило, использование данного подхода связано с введением замен аминокислотных остатков типа Gly/Ala, Xaa/Pro, ограничивающих конформационные перестройки, и с формированием дополнительных дисульфидных связей. Следует отметить, что, хотя использование энтропийной стабилизации далеко не всегда приводит к желательному эффекту, однако описан и ряд положительных результатов [5–10]. В то же время стабилизирующее действие данных замен в различных экспериментальных системах может осуществляться и на основе других молекулярных механизмов.

Анализ аминокислотных составов, последовательностей и пространственных структур родственных ферментов, существенно отличающихся по уровню термостабильности, явился, пожалуй, первым серьезным подходом к анализу молекулярных механизмов стабилизации белков. Такие исследования были выполнены на моделях ферредоксинов, лактатдегидрогеназ, протеиназ, амилаз и ферментов многих других групп [11–22]. Следует отметить, что основная проблема такого рода анализа – именно выбор подходящих экспериментальных моделей, что связано с высокой дивергенцией последовательностей в ходе эволюции белков. Пожалуй, наибольшей популярностью в этом качестве пользовались родственные ферменты мезофильных и термофильных микроорганизмов.

В этих работах, в первую очередь, была подчеркнута важность количества гидрофобных контактов и плотности упаковки аминокислотных остатков в ядре молекулы. Был также идентифицирован ряд стабилизирующих замен и предложено использовать их для повышения стабильности белков. Так, например, предлагалось вводить остатки Pro в петлевые области молекулы и использовать дополнительные дисульфидные связи. Следует особо отметить работы Аргоса с соавт. [11], которые не только идентифицировали большинство стабилизирующих замен, но и, пожалуй, первыми обратили внимание на особую

важность регулярных пространственных структур, в первую очередь α -спиралей, для стабильности белковых молекул. Ими был проведен многофакторный статистический анализ с целью идентификации аминокислотных замен, характерных для белков термофильных организмов по сравнению с их мезофильными аналогами. При этом принимались в расчет размер и объем боковой цепи аминокислотного остатка, ее гидрофобность, гибкость, предпочтительная конформация, заряд, локализация во вторичных структурах и др. Обязательным условием являлась также универсальность данных замен, то есть они должны были быть представлены во всех исследованных группах ферментов. В результате проведенного анализа был идентифицирован ряд статистически достоверных универсальных стабилизирующих замен аминокислотных остатков: Lys/Arg, Ser/Ala, Gly/Ala, Ser/Thr, Ile/Val, Lys/Ala, Thr/Ala, Lys/Glu, Glu/Arg, Asp/Arg.

Исследования Аргоса и соавт. были дополнены рядом аналогичных работ [12–14, 16–22]. Было продемонстрировано, что в рамках конкретных семейств могут быть выявлены дополнительные стабилизирующие замены – например: Asp/Glu, Lys/Gln, Val/Thr, Ser/Asn, Ile/Thr, Asn/Asp. Несмотря на высокую значимость обсуждаемых работ, необходимо отметить, что данный подход, основанный на статистическом анализе значительного числа аминокислотных последовательностей, имеет серьезный принципиальный недостаток. Поскольку невозможно осуществить детальную характеристику всех анализируемых ферментов в единых условиях, то при анализе, как правило, учитывали не реальную термостабильность данных белков, а лишь температурный оптимум существования их природных продуцентов. Очевидно, что соотношения между этими параметрами могут быть далеко не однозначными. Хотя в ряде работ продемонстрирована прямая корреляция между температурным оптимумом жизнеспособности организма и уровнем стабильности его ферментов, однако, и исключения из этого правила встречаются достаточно часто. Подчеркнем также, что выявленные закономерности могут быть существенны не для стабилизации белка как таковой, а, например, для эффективного формирования пространственной структуры ферментов при повышенных температурах.

Следует отметить, что несмотря на наличие серьезных сомнений в действенности данного подхода и на возможность формулирования значительного количества альтернативных гипотез, стабилизирующее действие выявленных замен было подтверждено во многих генно-инженерных экспериментах [1, 23–26]. Однако в количественном плане эффект индивидуальных замен, как правило, оказывается незначительным [23]. Это совпадает с широко известным фактом, что

белковые молекулы вообще достаточно толерантны к мутациям. При этом особенно высокой вариабельностью, как правило, отличаются остатки, боковые цепи которых экспонированы в растворитель. Однако многочисленные исследования показали, что вариабельность аминокислот внутри кора также может быть весьма существенной [2]. При этом особо значимым, по-видимому, является отсутствие жестких ограничений на размер гидрофобной боковой цепи [23]. Это может быть отражением того факта, что гидрофобные взаимодействия, в отличие от, например, формирования водородных связей, не являются специфичными в отношении контактирующих остатков. Таким образом, взаимодействие боковых цепей в гидрофобном коре молекулы, по-видимому, реализуется не по "комплементарному" механизму, а стерические напряжения, возникающие из-за изменения локальных объемов, могут быть нивелированы за счет конформационных изменений контактирующих радикалов и изменений в положении полипептидной цепи.

Высокая толерантность белков к заменам единичных аминокислотных остатков свидетельствует о том, что наиболее перспективным подходом для стабилизации ферментов методами генетической инженерии служит, по-видимому, поиск критических областей, существенных для стабильности молекулы в целом. В связи с этим следует еще раз отметить выдвинутое Аргосом с соавт. [11] предположение о значительной роли регулярных вторичных структур в стабилизации белковых молекул. Можно предположить, что эта роль может быть ключевой, поскольку даже локальное нарушение α -спиралей или β -складок, входящих в структуру гидрофобного кора молекулы, приводит к высвобождению в ядре белка полярных C=O- и N-H-групп, участвующих в образовании водородных связей. Эта точка зрения была косвенно подтверждена в экспериментах по компьютерному моделированию процессов термоинактивации лизоцима и барназы [27, 28]. Было сделано заключение, что ключевым моментом термоинактивации является частичная деструкция вторичных структур с вовлечением образовавшихся доноров и акцепторов водородных связей во взаимодействие с молекулами воды.

Изучение молекулярных механизмов стабилизации белков в настоящее время находится скорее на стадии описания и не позволяет делать достаточно обоснованных предсказаний. Однако развитие работ по направленной модификации молекул привело к формированию ряда достаточно общепринятых подходов к стабилизации, суть которых, отвлекаясь от рассмотрения конкретных примеров, можно обобщить несколькими эмпирическими правилами, т.е. уже упоминавшимися выше "советами белковому инженеру". Следует:

1. При введении замен аминокислотных остатков учитывать распределение консервативных областей в молекуле.

2. При планировании замен учитывать частоту встречаемости таких замен в природных белках, руководствуясь, например, матрицей Дейхофф [29].

3. Вводить замены, стабилизирующие регулярные вторичные структуры.

4. Заменять экспонированные в растворитель остатки.

5. Нейтрализовать заряды на N- и C-концах α -спиралей.

6. Вводить замены так, чтобы улучшать энергетику и увеличивать число образующихся водородных связей.

7. Увеличивать плотность упаковки остатков аминокислот в гидрофобном ядре молекулы.

8. Вводить выявленные ранее стабилизирующие замены.

9. Вводить дополнительные дисульфидные и ионные связи.

10. Вводить сайты связывания ионов металла [30].

11. Заменять остатки Asn, Cys и Met для предотвращения необратимой инактивации, обусловленной разрывом ковалентных связей [1].

Приведенная совокупность правил, по сути дела, постулирует вовлечение в стабилизацию белков ряда различных молекулярных механизмов, долевое участие которых, по-видимому, может существенно варьировать в зависимости от конкретной экспериментальной модели. Так, модель протейолитических ферментов имеет весьма существенные особенности. Напомним, что для большинства глобулярных белков термоинактивация осуществляется по принципу высококооперативной глобальной денатурации. В то же время ключевыми моментами в денатурации протейназа, по-видимому, являются возникновение локальных денатурированных областей и последующая необратимая автолитическая деградация (автолиз) [31–34]. В связи с этим как сам процесс термоинактивации ферментов данной группы, так и методология его изучения имеет свои, весьма существенные, особенности.

Основным термодинамическим параметром, характеризующим стабильность белковых молекул, является изменение свободной энергии ΔG , определяемое при исследовании равновесного процесса $N \rightleftharpoons D$, где N – нативное состояние молекулы, а D – денатурированное [35–40]. Для случая равновесного процесса определяется и другая чрезвычайно существенная величина – температура плавления (T_m), соответствующая температуре, при которой 50% молекул находятся в денатурированной форме. Однако наличие высокоэффектив-

ного автолиза делает невозможным установление данного равновесия и, таким образом, драматически усложняет использование термодинамических подходов. В настоящее время процесс термоинактивации протеолитических ферментов принято описывать уравнением $N + N \rightleftharpoons N + D \rightleftharpoons ND \rightarrow N + P$, где N – нативное состояние молекулы, D – денатурированное, ND – комплекс между нативной и денатурированной формами фермента, а P – образующиеся продукты гидролиза. При этом термостабильность протеиназ оценивается обычно по кинетике инактивации, а вместо величины T_m , как правило, используется значение T_{50} – температура (в градусах Цельсия), при которой после определенного времени инкубации (в большинстве работ 30 мин) сохраняется 50% протеолитической активности. Для данного уравнения предполагается, что автолиз протекает по межмолекулярному механизму. При этом в целом ряде работ [41–44] было продемонстрировано, что распознавание и гидролиз денатурированных молекул происходит значительно быстрее, чем их появление.

Проведенные исследования привели к формированию представлений о том, что центральную роль в термоинактивации протеиназ играют начальные стадии процесса, в результате которых образуются локально денатурированные молекулы, чувствительные к автолизу [42, 45]. Однако существующее на настоящий момент представление о “локальной денатурации” весьма расплывчато, как феноменологически, так и в плане происходящих молекулярных процессов.

Большое количество экспериментальных работ, направленных на изучение молекулярных механизмов стабилизации протеолитических ферментов, выполнено на модели термолизинподобных протеиназ. В большинстве случаев использовали ферменты *Bacillus subtilis* и *B. stearothermophilus*. При этом были введены десятки разнообразных мутаций, детально рассмотреть природу и эффект действия которых в рамках данного обзора не представляется ни возможным, ни целесообразным. Направленность этих работ включала практически весь набор сформулированных ранее “советов белковому инженеру”. Приведем только некоторые примеры.

Заполнение внутренних полостей молекул. Молекулы многих белков содержат внутренние полости, заполнение которых, приводящее к усилению гидрофобных взаимодействий, могло бы являться перспективным способом стабилизации, хотя положительных результатов в этом направлении получено довольно мало [46–48]. В случае металлопротеиназ данный метод был испробован на моделях ферментов *B. stearothermophilus* и *B. subtilis* [41, 49]. Практически все введенные мутации приводили к дестабилизации (в ряде слу-

чаев драматической) белка. В случае протеиназы *B. stearothermophilus* удалось добиться некоторой стабилизации фермента, но ее величина была весьма незначительной (ΔT_{50} 0.2–0.4°C) [49].

Нейтрализация зарядов на концах α -спиралей. Изучение влияния величины локализованных на концах α -спиралей зарядов на стабильность протеиназ было осуществлено группой Эйсинка с соавт. [50]. Исследование проводилось на модели металлопротеиназы *B. subtilis* с использованием расчетной пространственной структуры и включало замену остатков лизина (Lys²⁴⁹/Ser/Asp и Lys²⁹⁰/Ser/Asp), локализованных в N -концевых обводах α -спиралей 247–260 и 289–299. Достигнутая при этом стабилизация оказалась чрезвычайно слабой (ΔT_{50} 0.3–1.2°C).

Оптимизация внутримолекулярных водородных связей. В случае термолизинподобных металлопротеиназ работа проводилась на ферменте *B. stearothermophilus* [51–53]. Анализ расчетной структуры данного белка позволил обнаружить, что способный к акцепции водородной связи $O\delta$ -атом остатка Asn²⁴¹ погружен внутрь белковой глобулы. Согласно существующим представлениям, это должно оказывать дестабилизирующий эффект на молекулу. В связи с этим были предприняты, с одной стороны, эксперименты по конструированию замены Asn²⁴¹/Leu с целью удаления полярной группы из белкового кора, а с другой стороны – по введению в структуру остатка серина (Ala¹⁷⁰/Ser), способного, согласно результатам молекулярного моделирования, формировать внутримолекулярную водородную связь с Asn²⁴¹ [53]. В обоих случаях был достигнут слабый стабилизирующий эффект (ΔT_{50} 0.6–0.8°C).

Введение замен Gly/Ala/Pro. Мутации такого типа вводились в структуры протеиназ *B. stearothermophilus* и *B. subtilis* исследователями нескольких групп [14, 52, 54–57]. Как и следовало ожидать, результаты были получены весьма неоднозначные. Мутации Gly/Ala в большинстве случаев приводили к незначительным изменениям в термостабильности (ΔT_{50} от –0.2 до +0.6°C). Исключением явились замены Gly⁷⁸/Ala и Gly¹⁰⁷/Ala, вызывающие сильный дестабилизирующий эффект у фермента *B. subtilis*. При этом замены, оказывающие стабилизирующее действие, преимущественно локализовались в области α -спиралей. Введение остатков пролина в петлевые участки металлопротеиназы *B. stearothermophilus* приводило к более значительным, но также слабо предсказуемым эффектам. Так, ΔT_{50} для мутаций Thr⁶³/Pro, Ser⁶⁵/Pro, Tyr⁶⁶/Pro и Ala⁹⁶/Pro составили соответственно –10, +4.2, –16 и +5.6°C.

Стабилизация на основе сравнения последовательностей родственных белков. Основной сложностью, связанной с использованием такого подхода, служит тот факт, что степень гомологии

между родственными ферментами, значительно отличающимися по уровню термостабильности, как правило, довольно мала. Это затрудняет выявление замен, существенных для стабильности белка. Модель термолизинподобных металлопротеиназ оказалась счастливым исключением, поскольку фермент *B. stearothermophilus* отличается лишь тремя заменами в зрелой части от более стабильного фермента *B. caldolyticus* (ΔT_{50} 8,2°C). Интересно отметить, что на основе современных представлений ни одна из этих замен не может быть предсказана как существенная для термостабильности. Введение соответствующих мутаций [58] позволило увеличить термостабильность белка *B. stearothermophilus*. При этом ΔT_{50} мутаций Ala⁴/Thr, Thr⁵⁶/Ala и Thr⁶³/Phe составляли 1,8, 1,5 и 6,2°C соответственно. Важно подчеркнуть, что вклад двух последних мутаций не являлся аддитивным.

Модификация поверхностных областей ферментов по аналогии с более стабильными вариантами. Данный подход базируется на сравнении поверхностных структур термофильных и мезофильных представителей термолизинподобных металлопротеиназ. Было высказано предположение, что именно протяженные поверхностные петли, характерные для мезофильных протеолитических ферментов, – наиболее доступные области для протеолитической атаки при их локальной дестабилизации [59]. В связи с этим в структуру фермента *B. subtilis* была введена делеция, укорачивающая петлю 215–228 на 4 а. о. по аналогии с термолизином. Кроме этого, была добавлена (также по аналогии с термолизином) дополнительная β -шпилька протяженностью в 10 а. о. (предположительно стабилизирующая взаимодействие C-концевого и промежуточного субдоменов молекулы) и введено несколько точечных замен [45, 59–62]. В результате был получен набор мутантных ферментов, величина T_{50} которых была всего на 1–6°C выше, чем у природной протеиназы *B. subtilis*. Таким образом, эти работы не дали существенного результата в смысле повышения стабильности молекулы. Однако в общем плане они оказались весьма полезными. В первую очередь, в этих работах был еще раз подтвержден неаддитивный характер влияния индивидуальных мутаций на стабильность фермента в целом. Весьма важным представляется также тот факт, что был сконструирован фермент, около 10% поверхности которого было модифицировано. Это продемонстрировало возможность проведения заметных перестроек структур протеолитических ферментов без драматических нарушений их стабильности.

Введение областей связывания ионов Ca²⁺. Ситуация с изучением роли ионов Ca²⁺ в стабилизации секреторных металлопротеиназ бацилл носит достаточно парадоксальный характер. С одной

стороны, представление о том, что акцепция кальция является одним из центральных моментов, определяющих стабильность ферментов данной группы [63], широко обсуждается и считается общепризнанным. Однако направленное изучение влияния ионов Ca²⁺ методами белковой инженерии практически не проводилось. Кроме упомянутой выше статьи Эйсинка с соавт. [63], можно отметить лишь одну работу [64], направленную на прояснение данного вопроса. В ее основу были положены сведения о структуре ω -петли (аминокислотные остатки 192–201), осуществляющей связывание четвертого иона Ca²⁺ в молекуле термолизина. Было показано, что соответствующая область металлопротеиназы *B. subtilis* содержит делецию, предотвращающую связывание иона металла, и проведены эксперименты по введению ω -петли термолизина в структуру фермента *B. subtilis*. Однако достигнутые результаты оказались неоднозначны. Полученный мутантный фермент действительно связывал три иона Ca²⁺ вместо двух, однако по уровню термостабильности существенно уступал исходной протеиназе. Следует отметить, что стабильность мутантного фермента значительно возрастала при повышении концентрации кальция до 0,1–0,5 М, однако совокупность данных позволяет считать, что это не связано с его акцепцией районом ω -петли.

Таким образом, приведенные исследования позволяют сформулировать два положения:

1. Влияние мутаций на стабильность протеиназ зависит, по-видимому, не столько от природы аминокислотных остатков, используемых для замен, сколько от области их локализации.

2. Во многих случаях, и в первую очередь для замен близко расположенных аминокислотных остатков, стабилизирующее влияние нескольких мутаций оказывается ниже, чем расчетная сумма их индивидуальных эффектов, т.е. действие мутаций не аддитивно.

Механизмы, лежащие в основе этих явлений, были в значительной степени прояснены в серии работ, выполненных Эйсинком и соавт. [65–73]. Эти работы были направлены на изучение ранней стадии протеолитической деградации молекул металлопротеиназ.

В идеологическом плане эта серия исследований может быть разделена на две группы. К первой следует отнести работы, связанные с локализацией и последующей модификацией сайтов автолитического расщепления, находящихся на поверхности молекулы [65–67]. Они были выполнены на модели фермента *B. subtilis*. Напомним, что в обычных условиях автолитическая деградация приводит к расщеплению фермента на низкомолекулярные фрагменты. Однако, проводя процесс при пониженной температуре, удалось

обнаружить протяженные пептиды, определение *N*-концевых последовательностей которых позволило идентифицировать соответствующие сайты гидролиза. Всего было обнаружено пять расщепляемых связей, три из которых (Asn¹¹³-Ala, Gln¹²⁰-Met, Ser¹⁹⁷-Leu) были локализованы в поверхностных областях. Следующим шагом стала попытка стабилизации молекулы при помощи модификации этих участков. Так, были рассчитаны и введены две дисульфидные связи 102-120 и 186-194 (на основе замен Val¹⁰²/Cys, Gln¹²⁰/Cys, Glu¹⁸⁶/Cys, Ala¹⁹⁴/Cys), которые могли бы снизить конформационную подвижность идентифицированных районов, а также мутация Ile¹⁵⁷/Asn. Эта мутация практически не повлияла на стабильность протеиназы, в то время как введение дисульфидных связей вызвало сильный дестабилизирующий эффект. Таким образом, использованный подход оказался непродуктивным. Причиной данной неудачи, признаваемой и самими авторами, явилась, скорее всего, некорректная интерпретация результатов локализации сайтов автолиза. Использованная методология, вероятно, привела не к идентификации стартовых точек гидролиза, а к выявлению наиболее стабильных фрагментов расщепленной молекулы.

Вторая группа работ [68-73] базировалась на том факте, что протекание реакции инактивации протеиназы определяется, как отмечено выше, эффективностью появления чувствительных к протеолитической атаке денатурированных форм фермента. Однако области локальной денатурации могут возникать, хотя и с различной частотой, в разных областях молекулы. Это определяет возможность существования целого набора индивидуальных путей термоинактивации, связанных с автолитическим расщеплением различных пептидных связей в молекуле фермента. При этом эффективность реализации того или иного пути зависит от соответствующего ему уровня энергии активации, определяемой энтальпией денатурации (H^d), в данном случае локальной денатурации. Другими словами, если для возникновения локальной денатурации в определенной области молекулы требуется меньшее количество энергии, чем в других областях, то именно данный путь термоинактивации будет определяющим для протекания процесса в целом.

Исходя из этого возможны, по крайней мере, две различные ситуации: 1) процесс инактивации протеиназы характеризуется наличием значительного количества индивидуальных путей с близкими значениями H^d . В этом случае введение одиночных мутаций, блокирующих тот или иной из этих путей, не приведет к заметному результату, поскольку инактивация будет проходить по альтернативным механизмам; 2) существует всего несколько индивидуальных путей (в крайнем ва-

рианте один), характеризующихся существенно пониженными значениями H^d . В этом случае влияние "правильно" введенных мутаций на стабильность фермента в целом будет гораздо более значительным. При этом, очевидно, что введение дополнительных замен в уже стабилизированную ранее область не даст ощутимого результата и действие таких мутаций не будет аддитивным. Это явление обозначено как принцип "enough is enough". В то же время введение мутаций, повышающих значение H^d различных путей термоинактивации, должно давать синергический эффект, что хорошо соответствует экспериментальным данным [71].

В связи с высказанными предположениями был разработан идеологически новый подход к стабилизации термолизинподобных металлопротеиназ. Полагали, что, вводя в различные районы структуры белка индивидуальные замены и оценивая их влияние на изменение величины T_{50} (в сторону уменьшения или увеличения), можно будет идентифицировать области молекулы, вовлеченные в начальные этапы локальной денатурации. Последующая стабилизация этих районов предположительно должна была оказать существенное влияние на свойства молекулы в целом. Проведенные экспериментальные исследования продемонстрировали несомненную перспективность данного подхода.

В результате "сканирующего" мутагенеза на модели металлопротеиназы *B. stearothermophilus* было показано, что мутации, оказывающие наибольшее влияние на термостабильность фермента, "кластеризуются" в районе аминокислотных остатков 56-69 [67, 69, 73], который вовлечен в формирование β -складчатой структуры.

Следующим шагом явилась модификация локализованного района, для чего был использован уже несколько скомпрометировавший себя подход, основанный на создании дополнительной дисульфидной связи. Были введены мутации Gly⁸/Cys и Asn⁶⁰/Cys и продемонстрировано, что рассчитанная дисульфидная связь действительно формируется [70]. При этом результаты оценки влияния данных замен на стабильность белка оказались необычайно интересными. Так, изменение величины T_{50} при введении мутаций Gly⁸/Cys, Asn⁶⁰/Cys и Gly⁸/Cys + Asn⁶⁰/Cys составило соответственно -11, -16.2 и +16.7°C. При этом соответствующие значения, полученные в присутствии восстанавливающего агента, были равны -4.7, -7.9 и +11.8°C.

На настоящий момент эти данные не имеют однозначной интерпретации и обнаруженный значительный стабилизирующий эффект, видимо, связан не только с формированием дисульфидной связи, но и с образованием энергетически выгодной локальной конформации. В любом слу-

чае, значение T_{50} фермента, несущего двойную замену Gly⁸/Cys + Asn⁶⁰/Cys, составило 92.1°C. Этот успех подтолкнул к дальнейшей модификации идентифицированного района (что несколько нарушает принцип “enough is enough”), в результате чего был сконструирован “восьмикратный мутант”, несущий аминокислотные замены Ala⁴/Thr, Gly⁸/Cys, Thr⁵⁶/Ala, Gly⁵⁸/Ala, Asn⁶⁰/Cys, Thr⁶³/Phe, Ser⁶⁵/Pro и Ala⁶⁹/Pro [72]. Идеология конструирования именно такого мутантного фермента достаточно очевидна. Лишь 43 а. о. отличали последовательность зрелой металлопротеиназы *B. stearothermophilus* от структуры более стабильного термолизина. Ранее была проанализирована роль этих различий и показано [69], что только некоторые из них оказывают влияние на термостабильность. В “восьмикратном мутанте” использовано пять таких термолизинподобных замен: Ala⁴/Thr, Thr⁵⁶/Ala, Gly⁵⁸/Ala, Thr⁶³/Phe, Ala⁶⁹/Pro. Замена Ser⁶⁵/Pro не термолизинподобная. Она также была выявлена в данном районе молекулы как стабилизирующая и по своему характеру явно относилась к классической конформационной стабилизации. Оставшиеся две замены Gly⁸/Cys и Asn⁶⁰/Cys были обсуждены выше и являлись “идеологическим ядром” конструкции. К сожалению, не приводятся данные о парциальном вкладе конкретных использованных замен, однако стабильность суммарного мутанта оказалась весьма впечатляющей. Мутантный фермент был устойчив по отношению к действию ряда денатурирующих агентов (мочевина, додецилсульфат натрия, гуанидинхлорид), а время его полуинактивации при 100°C составило 170 мин. Таким образом, на модели металлопротеиназы *B. stearothermophilus* была решена сложнейшая экспериментальная задача по получению сверхстабилизированного фермента.

Необходимо отметить, что сконструированный фермент имел и еще одно весьма существенное и достаточно неожиданное свойство. Известно, что температурный коэффициент для энзиматических реакций (фактор, определяющий увеличение скорости реакции при повышении температуры на 10°C) в среднем соответствует 2 [74]. Простой расчет показывает, что в этом случае удельная активность ферментов экстремальных термофилов, функционирующих при 100°C, должна быть примерно в 60 раз выше, чем активность их мезофильных аналогов при 37°C. Однако экспериментальные данные показали, что родственные термофильные и мезофильные ферменты, как правило, имели примерно равные удельные активности в условиях их температурных оптимумов [74]. В этом смысле ферменты термофильных микроорганизмов являются достаточно плохими катализаторами [75]. Обычно это связывают с повышенной жесткостью белков-гипертермофилов, которая необходима для стабилизации ферментов, но пре-

пятствует конформационным перестройкам, связанным с актами катализа. “Восьмикратный мутант” явился исключением из данного правила, поскольку, хотя температурный оптимум его протеолитической активности увеличился на 21°C, удельная активность при 37°C не изменилась по сравнению с нативным ферментом. Причины этого, несомненно обнадеживающего с прикладной точки зрения, явления не ясны и, вероятно, связаны с локальным характером стабилизирующего воздействия [76], которое может в корне отличаться от тех механизмов, используемых природой для стабилизации белковых глобул и, в первую очередь, тех молекул, инактивация которых проходит, в отличие от протеиназ, по принципу глобальной денатурации.

В этой связи представляется уместным соображение о том, что может быть гораздо проще найти новые способы стабилизации белков, чем расшифровать соответствующие природные механизмы. Действительно, все мутации, использованные в описанной выше работе, введение которых в структуру молекулы металлопротеиназы *B. stearothermophilus* привело к столь яркому конечному результату, были локализованы в результате кропотливой экспериментальной деятельности. Ни одна из них не могла и в настоящее время не может быть достоверно предсказана теоретически, а их эффект не может быть ни обоснованно объяснен, ни рассчитан на основе современных представлений о структурно-функциональной организации белковых молекул. Таким образом, вопрос о молекулярных механизмах, определяющих стабильность белков, в том числе и протеолитических ферментов, по-прежнему остается открытым. Тем не менее, представляется вероятным, что собственно уровень термостабильности определяется “слабым звеном” (или звеньями) – тем участком молекулы, который раньше других утрачивает нативную структуру и претерпевает достаточно значимые конформационные изменения. В случае протеиназ такие перестройки приводят к эффективной автолитической деградации, а для белков других классов могут служить триггером процесса кооперативной денатурации. Этот процесс, на наш взгляд, мог бы протекать за счет взаимодействия молекул воды с донорами и акцепторами водородных связей, высвобождающимися при нарушении регулярных пространственных структур.

В связи с этим, одним из наиболее перспективных направлений в изучении молекулярных механизмов термостабильности представляется именно поиск “слабых звеньев” в структурах разных белков при помощи различных экспериментальных подходов. Возможно, что сравнение таких идентифицированных структур между собой и с другими областями молекул позволит предположить, какие факторы обуславливают их “слабость”, и наме-

тить новые направления для проведения экспериментальных исследований.

Работа поддержана грантами РФФИ № 03-04-48754 и № 03-04-48755.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Nosoh Y., Sekiguchi T. // Trends Biotechnol. 1990. V. 8. P. 16–20.
- Branden C., Tooze J. Introduction to Protein Structure. Second Ed. New York: Garland Publishing Inc., 1999.
- Tucker P.W., Perutz M.F. // J. Mol. Biol. 1977. V. 114. P. 415–420.
- Fersht A.R., Serrano L. // Nature. 1989. V. 342. P. 296–299.
- Matthews B.W., Nicholson H., Becktel W.J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1987. V. 84. P. 6663–6667.
- Matsumura M., Signor G., Matthews B.W. // Nature. 1989. V. 342. P. 291–293.
- Matsumura M., Becktel W.J., Levitt M., Matthews B.W. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989. V. 86. P. 6562–6566.
- Mitchinson C., Wells J.A. // Biochemistry. 1989. V. 28. P. 4807–4815.
- Cunningham B.C., Wells J.A. // Protein Eng. 1987. V. 1. P. 319–325.
- Pantoliano M.W., Whitlow M., Dodd J.F., Hardman S.W., Rollence M.L., Brian P.M. // Biochemistry. 1989. V. 28. P. 7205–7213.
- Argos P., Rossmann M.G., Grau U.M., Zuber H., Frank G., Tratschin J.D. // Biochemistry. 1979. V. 18. P. 5698–5703.
- Olsen K.W. // Int. J. Pept. Protein. Res. 1983. V. 22. P. 469–475.
- Haney P.J., Badger J.H., Buldak G.L., Reich C.I., Woese C.R., Olsen G.J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. V. 96. P. 3578–3583.
- Imanaka T., Shibasaki M., Takagi M. // Nature. 1986. V. 324. P. 695–697.
- Menendez-Arias L., Argos P. // J. Mol. Biol. 1989. V. 206. P. 397–406.
- Mrabet N.T., van den Broeck A., van den Brande I., Stanssens P., Laroche Y., Lambeir A.M., Matthijsens G., Jenkins J., Chiadmi M., van Tilbeurgh H. // Biochemistry. 1992. V. 31. P. 2239–2253.
- Perutz M.F., Raidt H. // Nature. 1975. V. 255. P. 256–257.
- Ruegg C., Ammer D., Lerch K. // J. Biol. Chem. 1982. V. 257. P. 6420–6426.
- Zuber H. // Biophys. Chem. 1988. V. 29. P. 171–179.
- Fontana A. // Biophys. Chem. 1988. V. 29. P. 181–193.
- Marino G., Nitti G., Arnone M.I., Sannia G., Gamba-corta A., De Rosa M. // J. Biol. Chem. 1988. V. 263. P. 12 305–12 309.
- Doonan S., Martini F., Angelaccio S., Pascarella S., Bara D., Bossa F. // J. Mol. Evol. 1986. V. 23. P. 328–335.
- Querol E., Perez-Pons J., Mozo-Villarias A. // Protein Eng. 1996. V. 9. P. 265–271.
- Fersht A.R., Leatherbarrow R.J. // Protein Eng. 1986. V. 1. P. 7–16.
- Knowles J.R. // Science. 1987. V. 236. P. 1252–1258.
- Ohmura T., Ueda T., Ootsuka K., Saito M., Imoto T. // Protein Sci. 2001. V. 10. P. 313–320.
- Mark A.E., van Gunsteren W.F. // Biochemistry. 1992. V. 31. P. 7745–7748.
- Cafilish A., Karplus M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994. V. 91. P. 1746–1750.
- Schwartz R.M., Dayhoff M.O. // Atlas of Protein Sequence and Structure / Ed. M.O. Dayhoff. Washington, DC: Natl. Biomed. Res. Found, 1978. V. 5. P. 353–358.
- Arnold F.H., Zhang J.H. // Trends Biotechnol. 1994. V. 12. P. 189–192.
- Dahlquist F.W., Long J.W., Bigbee W.L. // Biochemistry. 1976. V. 15. P. 1103–1111.
- Wells J.A., Powers D.B. // J. Biol. Chem. 1986. V. 261. P. 6564–6570.
- van den Burg B., Eijsink V.G., Stulp B.K., Venema G. // Biochem. J. 1990. V. 272. P. 93–97.
- Fassina G., Vita C., Dalzoppo D., Zamai M., Zamboni M., Fontana A. // Eur. J. Biochem. 1986. V. 156. P. 221–228.
- Pace C.N., Show K.L. // Proteins. 2000. V. 4. P. 1–7.
- Creighton T.E. // Biochem. J. 1990. V. 270. P. 1–16.
- Pace C.N. // Methods Enzymol. 1986. V. 131. P. 266–280.
- Pace C.N. // Trends Biotechnol. 1990. V. 8. P. 93–98.
- Becktel W.J., Baase W.A. // Biopolymers. 1987. V. 26. P. 619–623.
- Becktel W.J., Schellman J.A. // Biopolymers. 1987. V. 26. P. 1859–1877.
- Vriend G., Eijsink V.G. // J. Comput. Aided Mol. Des. 1993. V. 7. P. 367–396.
- Eijsink V.G., van den Burg B., Vriend G., Berendsen H.J., Venema G. // Biochem. Int. 1991. V. 24. P. 517–525.
- Kikodakoro S., Miki Y., Endo K., Wada A., Nagao H., Miyake T., Aoyama A., Yonea T., Kai K., Ooe S. // FEBS Lett. 1995. V. 367. P. 73–76.
- Braxton S., Wells J.A. // Biochemistry. 1992. V. 31. P. 7796–7801.
- Eijsink V.G., Vriend G., van der Vinne B., Hazes B., van den Burg B., Venema G. // Proteins. 1992. V. 14. P. 224–236.
- Karpusas M., Baase W.A., Matsumura M., Matthews B.W. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989. V. 86. P. 8237.
- Matsumura M., Becktel W.J., Matthews B.W. // Nature. 1989. V. 334. P. 406–410.
- Kimura S., Oda Y., Nakai T., Katayanagi K., Kitakuni E., Nakai C., Nakamura H., Ikehara M., Kanaya S. // Eur. J. Biochem. 1992. V. 206. P. 337–343.
- Eijsink V.G., Dijkstra B.W., Vriend G., van der Zee J.R., Veltman O.R., van der Vinne B., Kempe S., Venema G. // Protein Eng. 1992. V. 5. P. 421–426.
- Eijsink V.G., Vriend G., van den Burg B., van der Zee J.R., Venema G. // Protein Eng. 1992. V. 5. P. 165–170.
- Eijsink V.G., van der Zee J.R., van den Burg B., Vriend G., Venema G. // FEBS Lett. 1991. V. 282. P. 13–16.
- Vriend G., Berendsen H.J., van der Zee J.R., van den Burg B., Eijsink V.G. // Protein Eng. 1991. V. 4. P. 4941–4945.
- Eijsink V.G., Vriend G., van der Zee J.R., van den Burg B., Venema G. // Biochem. J. 1992. V. 285. P. 625–628.

54. Shortle D., Sites W.E., Meeker A.K. // *Biochemistry*. 1990. V. 29. P. 8033–8041.
55. Margarit I., Campagnoli S., Frigerio F., Grandi G., De Filippis V., Vontana A. // *Protein Eng.* 1992. V. 5. P. 543–550.
56. Hardy F., Vriend G., Veltman O.R., van der Vinne B., Venema G., Eijsink V.G. // *FEBS Lett.* 1993. V. 317. P. 89–92.
57. Nakamura S., Tanaka T., Yada R.Y., Nakai S. // *Protein Eng.* 1997. V. 10. P. 1263–1269.
58. van den Burg B., Enequist H.G., van der Haar M.E., Eijsink V.G., Stulp B.K., Venema G. // *J. Bacteriol.* 1991. V. 173. P. 4107–4115.
59. Hardy F., Vriend G., van der Vinne B., Frigerio F., Grandy G., Venema G., Eijsink V.G. // *Protein Eng.* 1994. V. 7. P. 425–430.
60. Eijsink V.G., Vriend G., van der Vinne B., van der Zee J.R., Veltman O.R., Stulp B.K., Venema G. // *Protein Eng.* 1992. V. 5. P. 157–163.
61. Eijsink V.G., Vriend G., van den Burg B., Venema G., Stulp B.K. // *Protein Eng.* 1990. V. 4. P. 99–104.
62. van den Burg B., Dijkstra B.W., Vriend G., van der Vinne B., Venema G., Eijsink V.G. // *Eur. J. Biochem.* 1994. V. 220. P. 981–985.
63. Veltman O.R., Vriend G., Berendsen H.J., van den Burg B., Venema G., Eijsink V.G. // *Biochemistry*. 1998. V. 37. P. 5312–5319.
64. Toma S., Campagnoli S., Margarit I., Gianna R., Grandi G., Bolognesi M., De Filippis V., Fontana A. // *Biochemistry*. 1991. V. 30. P. 97–106.
65. van den Burg B., Eijsink V.G., Stulp B.K., Venema G. // *Biochem. J.* 1990. V. 272. P. 93–97.
66. van den Burg B., Dijkstra B.W., van der Vinne B., Stulp B.K., Eijsink V.G., Venema G. // *Protein Eng.* 1993. V. 6. P. 521–527.
67. van den Burg B., Eijsink V.G., Vriend G., Veltman O.R., Venema G. // *Biotechnol. Appl. Biochem.* 1998. V. 27. P. 125–132.
68. Veltman O.R., Vriend G., Hardy F., Mansfeld J., van den Burg B., Venema G., Eijsink V.G. // *Eur. J. Biochem.* 1997. V. 248. P. 433–440.
69. Veltman O.R., Vriend G., Middelhoven P.J., van den Burg B., Venema G., Eijsink V.G. // *Protein Eng.* 1996. V. 9. P. 1181–1189.
70. Mansfeld J., Vriend G., Dijkstra B.W., Veltman O.R., van den Burg B., Venema G., Ulbrich-Hofmann R., Eijsink V.G. // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. P. 11152–11156.
71. Vriend G., Berendsen H.J., van den Burg B., Venema G., Eijsink V.G. // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. P. 35074–35077.
72. van den Burg B., Vriend G., Veltman O.R., Venema G., Eijsink V.G. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998. V. 95. P. 2056–2060.
73. Eijsink V.G., Veltman O.R., Aukema W., Vriend G., Venema G. // *Nat. Struct. Biol.* 1995. V. 2. P. 374–379.
74. Marshall C.J. // *Trends Biotechnol.* 1997. V. 15. P. 359–364.
75. Danson M.J., Hough D.W., Russell R.J.M., Taylor G.L., Pearl L. // *Protein Eng.* 1996. V. 9. P. 629–630.
76. Durrschmidt P., Mansfeld J., Ulbrich-Hofmann R. // *Eur. J. Biochem.* 2001. V. 268. P. 3612–3618.

Molecular Mechanisms of Stabilization of Proteolytic Enzymes: A Model of Thermolysin-Like Microbial Metalloproteases

I. V. Demidyuk[#], M. V. Zabolotskaya, D. R. Safina, and S. V. Kostrov

[#]Phone: +7 (095) 196-1853; fax: +7 (095) 196-0221; e-mail: duk@img.ras.ru

Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences, pl. Kurchatova 2, Moscow, 123182 Russia

The molecular mechanisms that ensure the stability of proteolytic proteins are discussed. The autolytic pathway of protease degradation is emphasized. Experiments aimed at increasing the thermal stability of thermolysin-like metalloproteases are comprehensively described. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2003, vol. 29, no. 5; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: proteolytic enzymes, spatial structure, thermal stability, thermolysin-like metalloproteases