



УДК 577.112.5.012.6:543.422.25

МУТАЦИЯ I87E ПРЕПЯТСТВУЕТ ДИМЕРИЗАЦИИ БАРСТАРА

© 2004 г. Д. С. Корчуганов*, А. А. Шульга*, Я. С. Ермолюк*,
В. А. Митькевич**,***, М. Я. Рейбарх*, С. Б. Нольде*,
А. А. Макаров**, А. С. Арсеньев**, М. П. Кирпичников*

*Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

**Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва;

***Центр медицинских исследований Университета Осло, Москва

Поступила в редакцию 20.10.2003 г. Принята к печати 14.11.2003 г.

Получен С40,82А;I87Е-мутант барстара, внутриклеточного ингибитора рибонуклеазы барназы из *Vacillus amyloliquefaciens*, и изучены его физико-химические свойства. Белок наработан в составе гибрида с тиоредоксином, а затем отделен от него при помощи энтерокиназы ЕКmax. Методом ЯМР показано, что С40,82А;I87Е-барстар сохраняет пространственную структуру природного белка и при этом не образует свойственных барстару гомодимеров в водном растворе. Он связывается с барназой с константой диссоциации $(6.6 \pm 1.1) \times 10^{-11}$ М и обладает другими физико-химическими свойствами, аналогичными свойствам природного барстара. Это позволяет использовать С40,82А;I87Е-мутант барстара вместо природного белка в тех исследованиях, где его димеризация нежелательна.

Ключевые слова: барстар, барназа, димеризация белков.

ВВЕДЕНИЕ

Барстар, внутриклеточный ингибитор рибонуклеазы барназы из *Vacillus amyloliquefaciens*, синтезируется бактериями для предотвращения токсического действия барназы на клетку [1]. Этот небольшой (89 а.о.) белок состоит из четырех α -спиралей и трехтяжевого β -листа. Барстар связывается с барназой, блокируя ее активный центр. Барстар, барназа и их прочный комплекс хорошо изучены с привлечением методов белковой инженерии, РСА, спектроскопии ЯМР, а также calorиметрическими методами (см. обзор [2]). Молекула барстара содержит два остатка цистеина (С40 и С82), которые не образуют дисульфидной связи [3, 4]. В большинстве исследований вместо рекомбинантного барстара дикого типа использовались мутанты, С82А-барстар или С40,82А-барстар (барстар А). Показано [4, 5], что эти мутации не влияют на структуру и функцию барстара, но позволяют избежать возникновения смеси молекул с восстановленными и окисленными цистеинами. При исследовании С82А-мутанта барстара методом РСА в кристаллографической ячейке был обнаружен симметричный гомодимер

с областью димеризации, противоположной центру связывания с барназой [6]. Аналогичный димер барстара был обнаружен и при РСА комплекса барстара А с барназой [7]. ЯМР-исследования барстара А в водном растворе показали существенное уширение кросс-пиков в спектрах ^1H - ^{15}N -HSQC для остатков, находящихся на участках взаимодействия мономеров [5]. Нами было показано, что этот эффект объясняется существованием равновесной смеси димер-мономер с обменом в миллисекундном временном диапазоне [8]. Концентрационные зависимости ширины линий в спектрах ЯМР позволили измерить константы скорости образования и распада димера. Для концентраций белка, обычно применяемых в ЯМР-исследованиях (2–3 мМ), около 40% молекул барстара А образуют димеры. Аналогичная концентрационная зависимость ширины спектральных линий для остатков, находящихся в области димеризации в молекуле барстара А, наблюдалась в HSQC-спектрах его комплекса с барназой.

Известно [9], что димеризация белка может существенно усложнить анализ данных ЯМР-релаксации ядер ^{15}N и привести к существенным ошибкам в определении времен корреляции внутренних движений τ_c и параметров порядка S^2 , полученных в рамках модельнезависимого подхода [10, 11]. При исследовании методом ЯМР динамики барстара А [5] и комплекса барстар–барназа [12] получены необычно большие значения параметров

Сокращения: барстар А и барстар АЕ – С40,82А- и С40,82А;I87Е-мутанты барстара; ДСК – дифференциальная сканирующая calorиметрия; РСА – рентгеноструктурный анализ; HSQC – спектр гетероядерной одноквантовой когерентности; NOESY – спектр ядерного эффекта Оверхаузера.

Автор для переписки (тел./факс: (095) 335-50-33; эл. почта: aars@nmr.ru).

порядка, которые, по-видимому, следует объяснить димеризацией комплексов.

Мы столкнулись с эффектом димеризации барстара А в растворе при попытке его исследования методом ЯМР [8]. Это стимулировало нас к созданию такого мутантного белка, который оставался бы мономером во всем используемом в спектроскопии ЯМР диапазоне концентраций белка и сохранял бы свою пространственную структуру и функциональные свойства. В данной работе получен мутант С40,82А;I87Е-барстар (барстар АЕ), который удовлетворяет описанным требованиям, и изучены его физико-химические свойства.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Наличие остатков I86, I87 и L88 в области контакта мономеров [8] свидетельствует о значительной роли гидрофобных взаимодействий в стабилизации димерной формы. Введение в эти участки электрического заряда должно сместить равновесие димер-мономер в сторону мономера. Для поиска подходящей мутации барстара А были применены методы молекулярного моделирования. Параметры оценки качества пространственных структур для мономеров (S_{mono}) и димеров (S_{dim}) различных мутантов барстара А (вычислены согласно работе [13]) приведены в табл. 1. Чем больше значение параметра S , тем лучше пространственная структура (димера или мономера) мутантного белка соответствует его аминокислотной последовательности [13]. Наибольшая величина S_{dim} принадлежит димеру барстара А, причем она более чем вдвое превышает величину S_{mono} для соответствующего мономера. Это хорошо согласуется с наличием равновесия димер-мономер в растворе барстара А [8]. Наибольшая величина S_{mono} среди рассмотренных мутантов принадлежит барстару А с мутацией I87E (барстар АЕ) (табл. 1, рис. 1) при сравнительно низком значении S_{dim} для этого белка. Таким образом, согласно данным молекулярного моделирования, мономерная форма барстара АЕ является наиболее стабильной, а его димер менее выгодным, чем димер барстара А (S_{dim} ниже).

Точечная мутация I87E была введена в ген барстара А при помощи метода ПЦР. К нашему удивлению, экспрессия мутантного гена в *E. coli* оказалась неудачной. Искомый мутантный белок не обнаруживался в бактериальных экстрактах, хотя выход барстара А в той же самой экспрессирующей системе был очень высоким (500–1000 мг/л). Как известно, гибридные системы экспрессии способны нередко разрешить проблемы, связанные с неудовлетворительным уровнем биосинтеза желаемого белка. Нам удалось наладить продукцию барстара АЕ, слитого с тиоредоксином через линкер, кодирующий последовательность GSGSGDDDDK. Это позволило в дальнейшем отделить барстар

Таблица 1. Параметры оценки качества пространственных структур барстара А и его мутантов (вычислено по методике работы [13])

Белок	S_{mono}	S_{dim}
Барстар А	46.79	99.35
I86A	45.88	97.53
I87A	46.49	98.96
L88A	46.67	99.01
I86E	43.27	92.22
I87E (барстар АЕ)*	47.36	96.06
L88E	45.94	92.85
I86D	44.25	93.10
I87D	46.92	96.04
L88D	46.44	94.93

* Получен и исследован в данной работе.

АЕ от белка-носителя с помощью энтерокиназы ЕКmax. Гибридный белок накапливался в клетках бактерий, выращенных на среде M9, в количествах около 100 мг/л. N-Концевая последовательность получаемого таким образом барстара АЕ не отличалась от последовательности барстара А (МККАVIN...).

Для исследования равновесия димер-мономер барстара АЕ в растворе был получен его ^{15}N -меченый аналог и измерены двумерные ^1H - ^{15}N -HSQC-спектры в диапазоне концентраций белка от 0.7 до 2.9 мМ. Большинство кросс-пиков в ^1H - ^{15}N -HSQC-спектре имели такие же хим. сдвиги, как и для ^{15}N -меченого барстара А [8]. ^1H - ^{15}N -кросс-пики некоторых остатков, находящихся в непосредственной близости от места мутации I87E, изменили свои хим. сдвиги и были отнесены при помощи трехмерного спектра ^1H - ^{15}N -NOESY-HSQC. Различия в хим. сдвигах кросс-пиков ^1H - ^{15}N барстара А и барстара АЕ локализованы, главным обра-

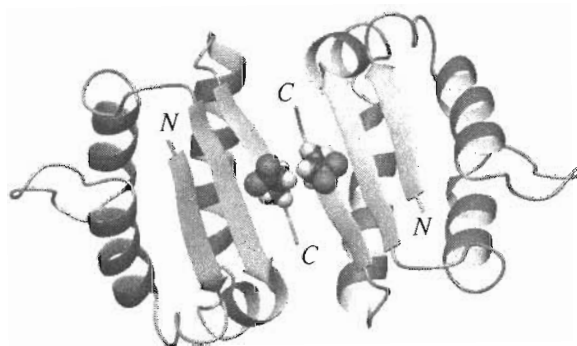


Рис. 1. Ленточная модель пространственной структуры димера барстара А с мутацией I87E, сконструированная при помощи программы MOLMOL [15]. Шарами показаны боковые цепи остатков E87.

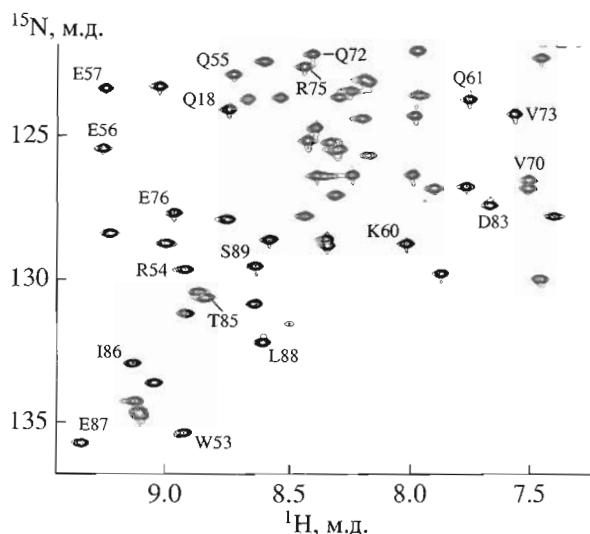


Рис. 2. Фрагмент спектра ^1H - ^{15}N -HSQC барстара АЕ при концентрации 2.9 мМ в 10 мМ фосфатном буфере (рН 6.5, 25°C). Кросс-пики, ширина которых зависела от концентрации белка в случае барстара А [8], обозначены однобуквенным кодом и номерами остатков в аминокислотной последовательности барстара АЕ.

зом, в районе второго (остатки 49–57*) и третьего β -тяжей (остатки 83, 85–89) и, в меньшей степени, первого β -тяжа (остатки 6 и 8). Кросс-пики ^1H - ^{15}N от большинства α -спиралей и петель сохранили свое положение в спектре HSQC (хим. сдвиги изменились менее чем на 0.04 м.д. по ^1H - и 0.4 м.д. по ^{15}N -направлениям), что указывает на сохранение пространственной структуры участка связывания с барназой (остатки 12–44). Не обнаружено никаких дополнительных и/или отсутствующих кросс-пиков в HSQC-спектре барстара АЕ по сравнению со спектром мономера барстара А (ср. [8]). Никаких заметных изменений хим. сдвигов остатков, расположенных в N -концевом фрагменте (K2, A3, V4), также не было обнаружено. Это свидетельствует о том, что энтерокиназа ЕКтах расщепляет гибридный белок в нужном положении, то есть сразу после линкерной последовательности.

В случае барстара А наблюдалась существенная концентрационная зависимость ширины спектральных линий в спектрах ^1H - ^{15}N -HSQC для ряда остатков, находящихся в области его димеризации [8]. При концентрации барстара А 2.5 мМ кросс-пики остатков W53, Q55, F56 и L88 из-за сильного увеличения их ширины полностью исчезли из спектра. В случае барстара АЕ кросс-пики тех же остатков в диапазоне концентраций от 0.7 до 2.9 мМ сохраняют свою ширину неизменной (рис. 2, спектр для концентрации 0.7 мМ не пока-

* Здесь и далее нумерация остатков приводится по аминокислотной последовательности природного барстара, которая отличается от последовательности рекомбинантных барстаров А и АЕ отсутствием первого метионина.

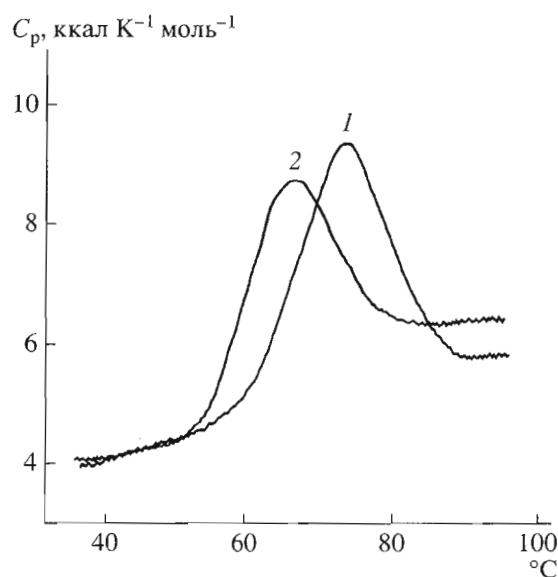


Рис. 3. Зависимость парциальной молярной теплоемкости барстара А (1) и барстара АЕ (2) от температуры в 10 мМ Na-ацетатном буфере, в присутствии 50 мМ NaCl (рН 6.2).

зан, так как он полностью идентичен изображенному спектру для концентрации 2.9 мМ). Таким образом, обмен димер-мономер в растворе барстара АЕ обнаружить не удастся.

Для проверки того, насколько мутация I87E барстара А повлияла на его физико-химические свойства и функциональную активность, изучены вторичная структура, тепловая денатурация мутантного белка, а также его способность связываться с барназой. Спектры КД барстара А и барстара АЕ в интервале длин волн 185–250 нм очень близки (данные не приведены), т.е. мутация не вызвала существенного изменения вторичной структуры белка. Это хорошо согласуется с данными ЯМР (см. выше). Кривые плавления ДСК (рис. 3) как барстара АЕ, так и барстара А имеют один пик, что указывает на наличие компактной третичной структуры в обоих случаях. Тепловая денатурация этих белков полностью обратима. Температура денатурации барстара АЕ (T_d), полученная методом ДСК, на 7.3°C ниже, чем у барстара А (рис. 3, табл. 2). Значения T_d , полученные из КД, близки к значениям, полученным при помощи ДСК (табл. 2). Следовательно, введение заряженного остатка в гидрофобный кластер привело к снижению термостабильности белка.

Константа диссоциации комплекса барстара АЕ с барназой лишь в восемь раз выше, чем для барстара А (табл. 2). Известно [14], что электростатический потенциал барстара дикого типа оптимизирован для тесного связывания с барназой. Введение дополнительного заряженного остатка

E87, по-видимому, нарушает это распределение зарядов и приводит к увеличению константы диссоциации. Тем не менее, барстар AE по-прежнему высокоспецифично и почти так же прочно связывается с барназой, как и барстар А.

Таким образом, получен C40,82A;I87E-мутант барстара, который не образует димеров в водном растворе в широком диапазоне его концентраций. Пространственная структура мутантного белка, его сродство к барназе и термостабильность в результате введения мутации изменяются незначительно. Это позволяет использовать барстар AE вместо барстара А в тех случаях, когда его димеризация нежелательна. В частности, барстар AE дает возможность провести корректное сравнение динамики барназы в свободном виде и в комплексе с ингибитором.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Молекулярное моделирование. Пространственные структуры мутантов барстара были сконструированы на основе пространственной структуры димера барстара А [6] с использованием программы MOLMOL [15]. Для подсчета параметров оценки качества пространственных структур использовалась программа Profiles-3D [13]. Параметры совместимости с пространственным окружением, даваемые программой для каждого остатка мономера и димера, были просуммированы по всем остаткам для получения $S_{\text{моно}}$ и $S_{\text{димер}}$ соответственно.

Получение C40,82A;I87E-барстара. Мутацию I87E в ген барстара А [16] вводили при помощи ПЦР. Ген мутантного барстара присоединяли с сохранением рамки считывания к 3'-концу гена тиоредоксина (*trxA*). Между двумя генами помещали линкер, кодирующий последовательность GSGSGDDDDK. В своем составе тиоредоксин содержал две замены (E30H и N62H), наделявшие его способностью взаимодействовать с ионами двухвалентных металлов (His-patch thioredoxin) [17]. Экспрессионный вектор рТНЮ/В* конструировали путем замены гена 10 бактериофага Т7 в плазмиде рGEMEX1 (Promega, США) гибридным геном. Нуклеотидная последовательность последнего была прочитана по двум цепям ДНК.

Штамм *E. coli* BL21 (DE3)(pLysS), трансформированный плазмидой рТНЮ/В*, выращивали на стандартной среде М9, содержащей 2 г/л $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ в качестве единственного источника азота и 200 мг/л ампициллина, при температуре 20°C в течение 48 ч. Собранные клетки разрушали при помощи ультразвукового дезинтегратора УЗДН-2Т. Белки осветленного лизата фракционировали при помощи металл-хелатной аффинной хроматографии на колонке с Ni^{2+} -сефарозой (Pharmacia, Швеция). Гибридный белок элюировали в градиенте концентрации имидазола (0–100 мМ, в растворе, со-

Таблица 2. Параметры тепловой денатурации барстара А и барстара AE (рН 6.2), полученные методом ДСК, и константы диссоциации их комплексов с барназой (рН 6.2, 25°C)

Белок	T_d , °C	ΔH_{cal} , ккал/моль	K_d , М
Барстар А	73.6 (73.7)*	73	$(8.1 \pm 0.7) \times 10^{-12}$
Барстар AE	66.3 (66.2)*	45	$(6.6 \pm 1.1) \times 10^{-11}$

* В скобках указаны значения температуры денатурации (погрешность 0.3°C), полученные по изменению эффекта КД на длине волны 222 нм.

держащем 50 мМ Трис-НСI, 0.15 М NaCl, рН 7.8), концентрировали и переводили в буферный раствор (50 мМ Трис-НСI, 10 мМ CaCl_2 , 1% Твин-20, рН 8.0) при помощи центрифужного концентратора Ultrafree-15, с мембраной BioMax-5 (Millipore, Франция). К раствору, содержащему 20 мг белка, добавляли 4 МЕ фермента ЕКmax (Invitrogen, США) и инкубировали при 4°C в течение 16 ч.

Гидролизат наносили на колонку, упакованную Ni^{2+} -сефарозой (Pharmacia, Швеция). Элюат, прошедший через колонку, диализовали против 20 мМ Трис-НСI, рН 7.6 и очищали при помощи градиентной хроматографии на колонке Mono Q HR10/10 (Pharmacia, Швеция) и гель-фильтрации на сефадексе G-50. Выход белка составил 15 мг/л. Если это не оговорено особо, эксперименты с белком проводили в растворе, содержащем 10 мМ Na-ацетат, 50 мМ NaCl, рН 6.2. Концентрацию белка определяли на спектрофотометре V-550 (Jasco, Япония), принимая молярный коэффициент поглощения при 280 нм равным $22714 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для барстара А и барстара AE [16].

ЯМР-исследования. ^1H - ^{15}N -HSQC-спектры [18] барстара AE в 10 мМ фосфатном буфере (рН 6.5) были получены при температуре 25°C для концентраций белка от 0.7 до 2.9 мМ на ЯМР-спектрометре Unity 600 (Varian, США) с рабочей частотой 600 МГц для протонов. Спектры состояли из $1984(^1\text{H}) \times 300(^{15}\text{N})$ комплексных точек и имели спектральную ширину 10000 Гц для ядер ^1H и 1900 Гц для ядер ^{15}N . Задержка на установление равновесия между циклами накопления данных составила 2 с. При обработке данных применялась аподизация функцией синус во второй степени с временными константами 0.08 и 0.135 с для прямого (^1H) и непрямого (^{15}N) направлений соответственно, а также дополнение нулями до 8192 комплексных точек по прямому и до 1024 комплексных точек по непрямому направлениям. Для отнесения ряда сигналов в барстаре AE, химичес-

кие сдвиги которых существенно изменились при введении мутации, получен трехмерный ^1H - ^{15}N -NOESY-HSQC-спектр [18] при концентрации барстара АЕ 0.7 мМ и времени смешивания 80 мс. Спектр размером 10000(f3) × 2200(f2) × 8000(f1) Гц состоял из 2112(f3) × 60(f2) × 160(f1) комплексных точек. После дополнения нулями размер матрицы составил 1024(f3) × 128(f2) × 512(f1) комплексных точек. Все экспериментальные данные были обработаны в программе VNMR (Varian, США), последующее отнесение сигналов проводилось с использованием программы XEASY [19].

ДСК, спектроскопия КД и измерение констант связывания с барназой. Калориметрические измерения проводили на микрокалориметре ДАСМ-4 (НПО "Биоприбор", Пущино, Россия) в ячейках объемом 0.48 мл, при скорости нагрева 1 К/мин. Концентрация белков в растворе, содержащем 10 мМ Na-ацетат, 50 мМ NaCl, pH 6.2, составляла 0.5–0.8 мг/мл. Температуру денатурации (T_d) и калориметрическую энтальпию денатурации (ΔH_{cal}) определяли, как описано ранее [20], принимая парциальный удельный объем для барстара равным 0.71 см³/г. Парциальный объем барстара был рассчитан по его аминокислотному составу в соответствии с работой [21]. Для анализа данных ДСК использовали пакет программного обеспечения SCAL2, разработанный в Институте белка РАН (Пущино, Россия). Точность определения величин калориметрических энтальпий составляла 6–8%, ошибка измерения T_d не превышала 0.2°C.

Спектры КД снимали на спектрополяриметре J-715 (Jasco, Япония). Для температурных измерений использовали водный циркулятор Neslab RTE-111 и кварцевые кюветы 0.02 см с водяными рубашками (Hellma Cells, США). Плавление растворов барстара А и барстара АЕ проводили с такой же, как и в микрокалориметрии, скоростью нагрева, 1 К/мин. Концентрация белков составляла 0.25 мг/мл. Результаты измерений выражали в единицах молярной эллиптичности, приходящейся на средний аминокислотный остаток, считая среднюю массу остатка равной 114.2 для барстара А и 114.4 для барстара АЕ.

Константы диссоциации (K_d) комплексов барназы с барстаром А и барстаром АЕ определяли титрованием фермента ингибитором, используя в качестве субстрата poly(I) как описано в работе [22].

БЛАГОДАРНОСТИ

Эта работа была поддержана грантами РФФИ № 02-04-48259, NIH FIRCA TW01058, Volkswagen Foundation 72758, а также программой "Физико-химическая биология" Российской академии наук и грантом НАТО LST.CLG.979534.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hartley R.W. // Trends Biochem. Sci. 1989. V. 14. P. 450–454.
- Hartley R.W. // Ribonucleases. Structures and Functions / Eds G. D'Alessio, J.F. Riordan. New York: Academic Press, 1997. P. 51–100.
- Frisch C., Schreiber G., Fersht A.R. // FEBS Lett. 1995. V. 370. P. 273–277.
- Ramachandran S., Udgaonkar J.B. // Biochemistry. 1996. V. 35. P. 8776–8785.
- Wong K.B., Fersht A.R., Freund S.M. // J. Mol. Biol. 1997. V. 268. P. 494–511.
- Ratnaparkhi G.S., Ramachandran S., Udgaonkar J.B., Varadarajan R. // Biochemistry. 1998. V. 37. P. 6958–6966.
- Buckle A.M., Schreiber G., Fersht A.R. // Biochemistry. 1994. V. 33. P. 8878–8889.
- Korchuganov D.S., Nolde S.B., Reibarkh M.Y., Orekhov V.Y., Schulga A.A., Ermolyuk Y.S., Kirpichnikov M.P., Arseniev A.S. // J. Am. Chem. Soc. 2001. V. 123. P. 2068–2069.
- Schurr J.M., Babcock H.P., Fujimoto B.S. // J. Magn. Reson. B. 1994. V. 105. P. 211–224.
- Lipari G., Szabo A. // J. Am. Chem. Soc. 1982. V. 104. P. 4546–4559.
- Lipari G., Szabo A. // J. Am. Chem. Soc. 1982. V. 104. P. 4559–4570.
- Sahu S.C., Bhuyan A.K., Udgaonkar J.B., Hosur R.V. // J. Biomol. NMR. 2000. V. 18. P. 107–118.
- Luthy R., Bowie J.U., Eisenberg D. // Nature. 1992. V. 356. P. 83–85.
- Lee L.P., Tidor B. // Nat. Struct. Biol. 2001. V. 8. P. 73–76.
- Koradi R., Billeter M., Wuthrich K. // J. Mol. Graphics. 1996. V. 14. P. 51–55.
- Protasevich I.I., Schulga A.A., Vasilieva L.I., Polyakov K.M., Lobachov V.M., Hartley R.W., Kirpichnikov M.P., Makarov A.A. // FEBS Lett. 1999. V. 445. P. 384–388.
- Lu Z., DiBlasio-Smith E.A., Grant K.L., Warne N.W., LaVallie E.R., Collins-Racie L.A., Follettie M.T., Williamson M.J., McCoy J.M. // J. Biol. Chem. 1996. V. 271. P. 5059–5065.
- Zhang O., Kay L.E., Olivier J.P., Forman-Kay J.D. // J. Biomol. NMR. 1994. V. 4. P. 845–858.
- Bartels C., Xia T.H., Billeter M., Guntert P., Wuthrich K. // J. Biomol. NMR. 1995. V. 6. P. 1–10.
- Makarov A.A., Protasevich I.I., Frank E.G., Grishina I.B., Bolotina I.A., Esipova N.G. // Biochim. Biophys. Acta. 1991. V. 1078. P. 283–288.
- Makhatazde G.I., Medvedkin V.N., Privalov P.L. // Biopolymers. 1990. V. 30. P. 1001–1010.
- Yakovlev G.I., Moiseyev G.P., Protasevich I.I., Ranjbar B., Bocharov A.L., Kirpichnikov M.P., Gilli R.M., Briand C.M., Hartley R.W., Makarov A.A. // FEBS Lett. 1995. V. 336. P. 156–158.

I87E Mutation Prevents Barstar Dimerization

D. S. Korchuganov¹, A. A. Schulga¹, Ya. S. Ermolyuk¹, V. A. Mitkevich^{2,3},
M. Ya. Reibarkh¹, S. B. Nolde¹, A. A. Makarov², A. S. Arseniev^{1#}, and M. P. Kirpichnikov¹

#Phonelfax: +7(095) 335-5033; e-mail: aars@nmr.ru

¹Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

²Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences,
ul. Vavilova 32, Moscow, 119991 Russia

³The Center for Medical Studies at Moscow, University of Oslo,
ul. Vavilova 34/5, Moscow, 119991 Russia

The C40,82A;I87E mutant of barstar, an intracellular inhibitor of the ribonuclease barnase from *Bacillus amyloliquefaciens*, was obtained, and its physicochemical properties were studied. It was produced as a fusion protein with thioredoxin and then cleaved from this by EKmax enterokinase. The mutant was shown by NMR to retain the spatial structure of the wild-type protein but, in contrast to barstar, does not form the homodimers characteristic of barstar in aqueous solution. The mutant protein binds barnase with the dissociation constant $(6.6 \pm 1.1) \times 10^{-11}$ M and exhibits other physicochemical properties similar to those of the wild-type barstar. This allows the use of C40,82A;I87E mutant instead of wild-type barstar in investigations where the protein dimerization is undesirable. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2004, vol. 30, no. 6; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: barnase, barstar, protein dimerization