

На правах рукописи

КОТЛЯРОВА

Вероника Александровна

Изменение аллостерической регуляции N-ацетилглутамат синтетазы и карбамоилфосфат синтетазы *Escherichia coli* методом комбинаторного мутагенеза.

03.00.03 – молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва, 2006 г.

Работа выполнена в лаборатории №2 Научно-исследовательского института «Аджиномото-Генетика» (ЗАО «АГРИ»).

Научный руководитель:

кандидат химических наук

Л.Р. Птицын

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор.

А.С. Миронов

кандидат биологических наук

М.А. Эльдаров

Ведущая организация:

Институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича Российской академии медицинских наук

Защита диссертации состоится « 21 » _____ декабря 2006 г. в 14 часов на заседании Диссертационного совета Д.217.013.01 при ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов» по адресу: 117545, г. Москва, 1-й Дорожный проезд, д. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГУП «ГосНИИгенетика».

Автореферат разослан « 17 » ноября 2006 г.

Ученый секретарь

Диссертационного Совета,

кандидат биологических наук

Г.Г. Заиграева

Актуальность проблемы

В настоящее время аминокислоты приобрели огромное промышленное значение. Область их применения необычайно широка, от использования в качестве компонентов пищевых добавок до создания на их основе лекарственных форм и разнообразной косметики. Современное производство аминокислот исчисляется миллионами тонн в год, а совокупный объем продаж – миллиардами долларов. Очевидно, что стремительно развивающийся рынок аминокислот и продуктов, созданных на их основе будет требовать адекватного увеличения их производства (Bongaerts J. et al., 2001). На сегодняшний день практически безальтернативным способом массового производства большинства аминокислот является их микробный синтез. Эффективность этого биотехнологического процесса во многом зависит от характеристик используемого бактериального штамма-продуцента. В процессе его конструирования необходимо решать множество задач, связанных с различными сторонами жизнедеятельности бактерий. К ним можно отнести оптимизацию экспрессии генов биосинтеза целевой аминокислоты, энергетическое обеспечение биосинтеза, повышение эффективности транспорта в клетку питательных веществ и экспорта целевой аминокислоты в культуральную жидкость, и т.д.

Одним из важнейших аспектов общей стратегии создания штаммов-продуцентов аминокислот и других биогенных молекул является модификация аллостерической регуляции ключевых ферментов их биосинтеза. Частный случай аллостерической регуляции, ретроингибирование, является одним из основных способов контроля скорости биосинтеза аминокислот и других биогенных молекул. Этот процесс основан на принципе отрицательной обратной связи, когда продукт биосинтетической цепи подавляет активность фермента, катализирующего первую стадию. Как правило, подобной регуляции подвержены ферменты, катализирующие практически необратимые биохимические реакции. Перераспределяя потоки ключевых молекул между клеточным метаболизмом и синтезом данного вещества (например – аминокислоты или нуклеотидов) в зависимости от его концентрации, эти белки выполняют функцию своеобразных “метаболических клапанов”, обеспечивающих клеточный гомеостаз.

Очевидно, что для создания высокоэффективных штаммов-продуцентов аминокислот необходимо конструирование таких мутантных белков, аллостерическое ингибирование которых конечными продуктами реакций было бы нарушено (*fbr, feed back resistance* фенотип). Как правило, *fbr* фенотип фермента достигается как результат замены одного аминокислотного остатка на другой в одном или нескольких сайтах белковой последовательности.

Поиск и идентификация *fbr* мутантов всегда являлось достаточно трудоемкой задачей. Эти мутации обычно возникают спонтанно при благоприятных для этого условиях и соответствующей системе отбора (Vyas and Maas, 1963; Гаврилова и соавт., 1988; Di Girolamo et al., 1988). С другой стороны, основываясь на анализе трехмерной структуры белка, можно вводить те или иные замены аминокислотных остатков, изменяя его кинетические характеристики. Однако, современный уровень понимания структурно-функциональных связей в белках пока еще недостаточен для проведения успешного рационального дизайна ферментов и полученные таким образом мутанты имеют существенно более низкую специфическую активность по сравнению с ферментом дикого типа (например, в случае мутантов фермента SAT, Nakamori et al., 1998; мутантов пантотенат киназы, Rock et al., 2003; мутантов префенат дегидратазы, Hsu et al., 2004).

Таким образом, получение ферментов со снятым ретроингибированием и одновременным сохранением его основных кинетических параметров во многом определяется экспериментальным везением. В этой связи, весьма актуальной представляется задача разработки новых методологических подходов к проблеме получения модифицированных аллостерических ферментов с заданными функциональными параметрами.

Цели и задачи работы

Целью данной работы являлось применение метода комбинаторного мутагенеза для модификации аллостерической регуляции N-ацетилглутамат синтетазы (NAGS) и карбамоилфосфат синтетазы (CPSase) из клеток *Escherichia coli*.

В ходе работы были решены следующие задачи:

- разработка метода эффективного направленного мутагенеза, позволяющего получать “библиотеку” мутантных генов, кодирующих белки, которые различаются по нескольким аминокислотам в одном заданном участке аминокислотной последовательности;
- получение *fbr* мутантов NAGS, обладающих высоким уровнем специфической активности и исследование их основных кинетических параметров;
- получение *fbr* мутантов CPSase, нечувствительных к ингибированию UMP и обладающих высоким уровнем специфической активности;
- применение модифицированных ферментов в процессе создания штаммов-продуцентов аргинина и оротовой кислоты на основе *E. coli*.

Научная новизна и практическая ценность работы

Разработана оригинальная методика эффективного направленного мутагенеза (метод комбинаторного мутагенеза), позволяющего получать библиотеку генов, кодирующих представительную выборку белков, различающихся по нескольким аминокислотам в одном специфическом участке.

Впервые была показана возможность применения данного метода для получения не подверженных ретроингибированию ферментов: NAGS и CPSase из *E. coli*. В каждом случае из совокупности мутантных белков удалось отобрать ферменты с заданными свойствами без использования специальных методов селекции.

На примере NAGS показано, что предложенный подход позволяет получать серию мутантов с измененными в широком диапазоне основными кинетическими параметрами ферментов (K_M , V_{max}). Полученная коллекция мутантных белков может быть использована для дальнейших экспериментов по изучению их структуры и функций.

Показано, что полученные с помощью метода комбинаторного мутагенеза мутанты могут быть эффективно использованы при конструировании штаммов-продуцентов аминокислот (нуклеотидов) на этапе оптимизации экспрессии генов аллостерических ферментов, что нашло отражение в соответствующем патенте.

Апробация работы

Материалы диссертации были представлены на III Московском международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 14-18 марта 2005) и на 30-м FEBS Конгрессе – 9-й IUBMB Конференции (30th FEBS Congress – 9th IUBMB Conference, Венгрия, Будапешт, 2-7 июля 2005). Диссертационная работа была апробирована на межлабораторном семинаре ЗАО «АГРИ» 18 октября 2006г.

Публикации

По теме диссертации опубликовано четыре печатные работы, из них одна в отечественном журнале, два тезисных сообщения в материалах научных конференций и одна патентная заявка.

Структура и объем работы

Диссертация состоит из Введения, Обзора литературы, Материалов и методов, Результатов и обсуждения, Выводов и Списка литературы. Работа изложена на 103 страницах, включая 16 рисунков и 12 таблиц. Список цитируемой литературы содержит 149 источников, в том числе 5 на русском языке.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Бактериальные штаммы, плазмиды, среды. При выполнении работы использовались следующие штаммы *E.coli*: TG1, MG1655, B3083 (*argA*, *metB*), B6969(*carB*::Tn10), B8085 (*argA*::Tn10) которые были получены из музея ФГУП ГНИИгенетика. Штамм-продуцент аргинина B7925 (*ilvA*::Tn5, *argR*) любезно предоставлен к.б.н. Гусятинером М.М.

В работе использованы следующие созданные ранее, а также коммерчески доступные плазмиды: pMW118 (GenBank/EMBL accession number AB005475), pKK233-2 (Pharmacia), pET22-b(+) (Novagen), pUC19-ArgA (предоставлена к.б.н. Ростовской Ю.Г., АГРИ), pBScarAB-13 (предоставлена к.б.н. Ростовской Ю.Г., АГРИ).

В качестве полноценной среды использовали L-бульон или L-агар, в качестве минимальной – жидкую или агаризованную среду M9 с необходимыми добавками. Для обеспечения селективного давления в среду добавляли ампициллин (100 мкг/мл).

Все генно-инженерные манипуляции, проведение Ca^{2+} -зависимой трансформации клеток, а также электрофорез белков в ПААГ осуществляли в соответствии со стандартными методиками (Маниатис Т. и соавт., 1984; Laemmli, 1970).

Создание библиотек генов. Библиотеки мутантных генов были получены методом ПЦР, с использованием рандомизированных синтетических олигонуклеотидов в качестве праймеров и ДНК интактного гена в качестве матрицы.

Очистка белка. Очистка NAGS и ее производных проводилась согласно методике, описанной (Marvil and Leisinger, 1977) с модификациями.

Определение активностей ферментов. Активность NAGS в грубых и частично очищенных клеточных лизатах определяли спектрофотометрическим методом (Meth. Enzymol. 25, 457, 1972). Специфическую активность NAGS в препаратах очищенных белков оценивали по скорости синтеза N-ацетилглутамата из L-глутамата и ацетил-CoA. Абсолютную концентрацию N-ацетилглутамата в реакционной смеси определяли путем разделения ее компонентов с помощью капиллярного электрофореза. Аналогичный подход был использован для исследования активности модифицированных вариантов CPSase в частично очищенных клеточных лизатах. В этом случае, активность фермента определяли по скорости синтеза карбамоилфосфата.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Метод комбинаторного мутагенеза.

В основе метода комбинаторного мутагенеза лежит идея о возможности компенсировать негативное влияние одной аминокислотной замены на активность

фермента за счет одновременного изменения нескольких соседних аминокислотных остатков (Птицын Л. Р. и соавт., 1998). Количество варьируемых аминокислот зависит от конкретного белка и должно определяться опытным путем или на основе структурного анализа исследуемого белка (если это возможно).

С методической точки зрения, для реализации данного метода необходимо уметь эффективно вводить множественные мутации в заданный участок структурной части гена. При этом необходимо получить представительную библиотеку фрагментов ДНК с рандомизированным локусом (т.е. случайной последовательностью нуклеотидов на участке, кодирующем варьируемые аминокислотные остатки), удобную для последующего клонирования. Схема предложенного нами оригинального решения этой задачи представлена на рис. 1.

На первом этапе синтезируется специальный олигонуклеотидный праймер Р1 (точнее – библиотека праймеров, однако далее, для краткости, мы будем использовать выражение – праймер Р1), первичная структура которого состоит из трех элементов: 1– полностью (или частично) рандомизированный участок структурной части гена, кодирующий варьируемые аминокислотные остатки; 2 и 3 – 5' и 3' – фланкирующие олигонуклеотидные последовательности полностью гомологичные участкам гена, непосредственно примыкающим к варьируемому локусу. Например, структура типичного праймера для варьирования 5 аминокислотных остатков выглядит следующим образом (5'-15н.-15N-20н.-3'). Используя библиотеку праймеров Р1 и

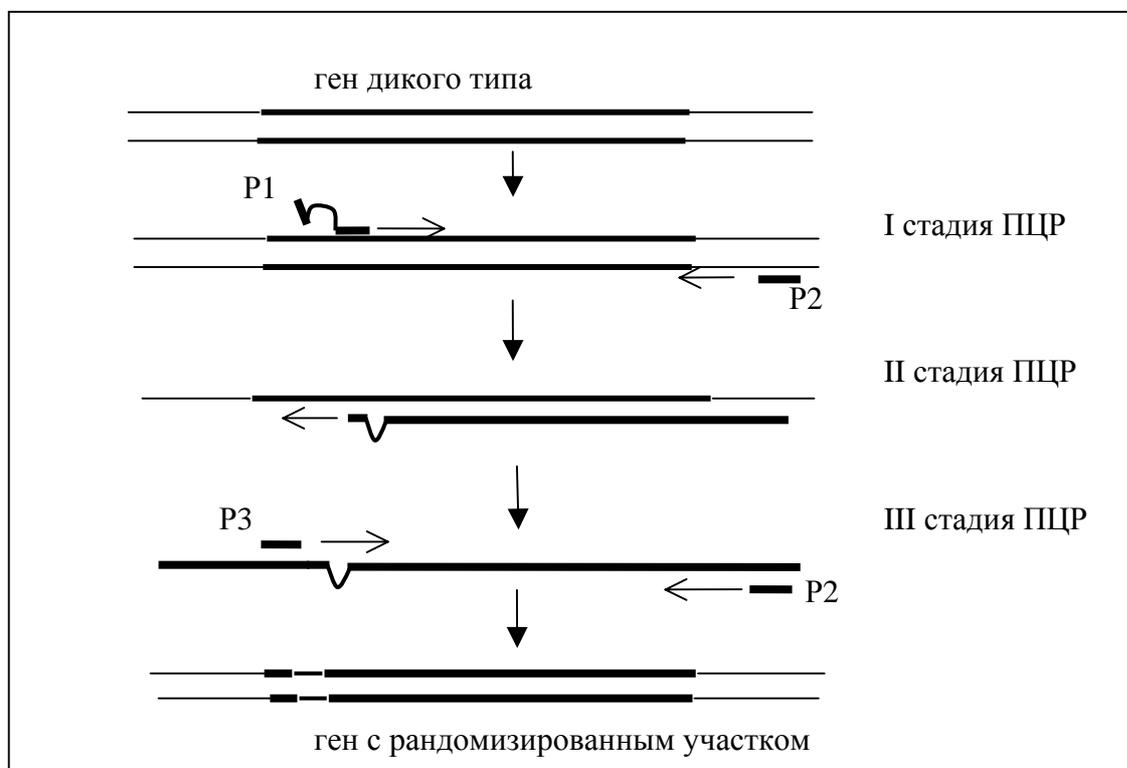


Рисунок 1. Схема практической реализации метода комбинаторного мутагенеза с помощью рандомизированных олиго-праймеров.

олигонуклеотид Р2, проводят синтез библиотеки фрагментов ДНК содержащих рандомизированный локус (рисунок 1, I стадия ПЦР). Как правило, в структуру праймера Р2 вводится последовательность уникального сайта рестрикции с целью последующего клонирования полученных мутантных фрагментов ДНК в экспрессионный вектор. Начальные концентрации матричной ДНК и праймеров Р1, Р2 выбираются таким образом, чтобы к концу ПЦР практически все праймеры были израсходованы, а количество синтезированного фрагмента (в молях) превосходило количество матричной ДНК не менее чем в 10 раз. При этом, очевидно, должна быть обеспечена представительность синтезированной библиотеки ДНК фрагментов. Например, упомянутой выше библиотеке Р1 (5'-15н.-15N-20н.-3') соответствует степень вырождения – $4^{15} = 1,1 \times 10^9$. Таким образом, в реакционной смеси должно присутствовать не менее (а реально существенно больше) 10^9 молекул матричной ДНК (0,002 пмоль) с тем, чтобы обеспечить равновероятный отжиг всех возможных вариантов олиго-праймера в каждом цикле ПЦР. Например, если в качестве матричной ДНК используется вектор размером 5 т.п.н, то в реакцию необходимо добавить как минимум 7 нг плазмидной ДНК.

На втором этапе, одна из цепей амплифицированного фрагмента используется в качестве праймера для амплификации библиотеки одноцепочечных молекул ДНК, содержащих структурную часть гена с рандомизированным участком (рисунок 1, II стадия ПЦР). Для амплификации используется реакционная смесь, полученная на предыдущей стадии. Как правило, проводят 10 – 20 дополнительных циклов, используя “холодный отжиг” (Т отжига = 37 °С). Время достройки выбирают таким образом, чтобы пролонгировать синтез одноцепочечной ДНК как минимум до 5'-конца структурной части гена или (если это возможно) - до ближайшего уникального сайта рестрикции.

На последнем этапе проводят амплификацию библиотеки ДНК-фрагментов, содержащих структурную часть гена с рандомизированным участком и фланкированных уникальными сайтами рестрикции (рисунок 1, III стадия ПЦР). Поскольку в этом случае происходит одновременное праймирование как модифицированной одноцепочечной ДНК, так и интактной матричной ДНК, то в результирующей реакционной смеси будут присутствовать ДНК фрагменты, соответствующие исходному гену. Именно поэтому, на первом этапе амплификации необходимо получать 10 и более - кратный избыток амплифицированного фрагмента по отношению к матричной ДНК. Это позволяет минимизировать представленность интактного гена в полученной библиотеке.

Наличие уникальных сайтов рестрикции позволяет легко клонировать полученную совокупность фрагментов ДНК в подходящий экспрессионный вектор. В результате

получают совокупность плазмид, кодирующих мутантные белки со случайными аминокислотными заменами в строго определенном участке, которые могут быть использованы для дальнейшего отбора функциональных мутантов.

Полная рандомизация нуклеотидного фрагмента гена кодирующего N аминокислотных остатков соответствует библиотеке из 4^{3N} генов кодирующих 20^N различных вариантов белков. Простой подсчет показывает, что уже при $N=4$ общее число клонов, включающих в себя полный объем библиотеки рандомизированных белков, составляет около $1,6 \times 10^5$, что создает трудности при их анализе. С другой стороны, интуитивно понятно, что чем больше рандомизированный участок, тем больше вероятность добиться хорошего компенсаторного эффекта за счет увеличения вероятности “взаимогашения” негативных влияний варьируемых аминокислотных остатков. Таким образом, выбирая N достаточно большим, мы с одной стороны, увеличиваем вероятность создания комбинации аминокислотных остатков дающих компенсаторный эффект, а с другой – уменьшаем вероятность обнаружить эту комбинацию из-за возможности анализа только небольшой выборки рандомизированных генов. Однако достаточно большой опыт применения метода комбинаторного мутагенеза в нашей лаборатории показал, что при $N=5$ (3 200 000 вариантов белка), достаточно лишь небольшой выборки “активных вариантов” модифицированного белка (порядка $10^2 - 10^3$), чтобы получить фермент с достаточно высоким уровнем специфической активности. Термин “активные варианты” в данном случае обозначает мутантные белки, продукция которых способна комплементировать делецию соответствующего интактного гена в штамме реципиенте.

2. Применение метода комбинаторного мутагенеза для изменения аллостерической регуляции *N*-ацетилглютамат синтетазы из *E. coli*.

В качестве первого объекта для модификации методом комбинаторного мутагенеза в данной работе был использован фермент NAGS из *E. coli*, катализирующий первую реакцию в пути биосинтеза аргинина. Ретроингибирование этого фермента аргинином создает серьезные проблемы на пути создания высокоэффективного штамма-продуцента этой аминокислоты. Ранее были локализованы две *fbr* мутации (His15Tyr, Tyr19Cys) NAGS, присутствие которых существенно снижало специфическую активность фермента (Rajagopal et al., 1998). Целью нашей работы было получение *fbr* мутанта NAGS с высокой удельной активностью методом комбинаторного мутагенеза.

2.1. Конструирование рандомизированной библиотеки генов *argA*.

Конструирование рандомизированной библиотеки генов *argA* проводили согласно методу, описанному выше (см. рис. 1). В качестве матрицы была использована плазмида pUC19-ArgA, несущая интактный ген *argA*, а в качестве праймеров олигонуклеотиды P1: 5'-cgagggattccgcNNNNNNNNNNNNNNNNatcaataccaccggg-3', частично комплементарный последовательности гена *argA*; P2, комплементарный последовательности плазмидного вектора расположенной downstream относительно структурной части гена *argA* и P3: 5'-tgccatggtaaaggaacgtaaaacc-3', гомологичный 5'-концу последовательности гена *argA*.

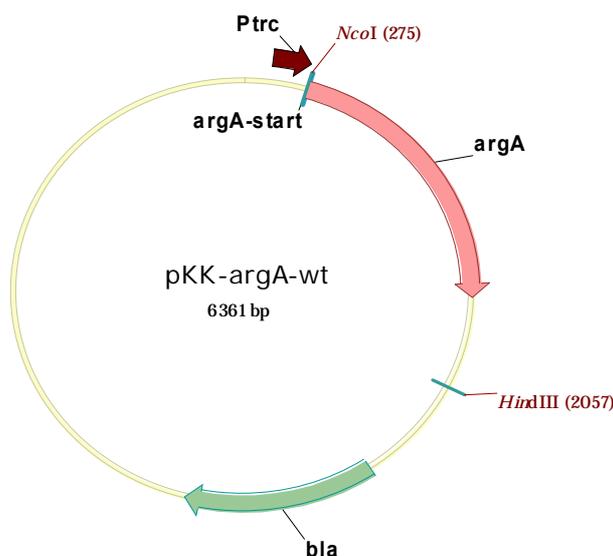


Рисунок 2. Структура рекомбинантной плазмиды pKK-argA-wt.

полученной плазмиды представлена на рис. 2). Примерно 150 нг лигазной смеси было использовано для трансформации реципиентных клеток *E. coli* штамма TG1, что вело к образованию около 3×10^3 рекомбинантных клонов.

2.2. Селекция “активных вариантов” модифицированной N-ацетилглутамат синтетазы.

Среди всех клонов штамма TG1 (pKKA_{gA}-random) нами были обнаружены несколько более “прозрачных” колоний, имеющих также меньший размер по сравнению с колониями штамма TG1(pKKA_{gA}-wt) (в среднем на 10^3 колоний нормального “типичного” размера приходилась одна мелкая). Мы предположили, что этот эффект может быть связан с суперэкспрессией гена, кодирующего высокоактивный *fbr*-фермент NAGS. В дальнейшем наши предположения подтвердились.

Таким образом, нами был полностью рандомизирован 15-ти нуклеотидный фрагмент гена, кодирующий 5 аминокислотных остатков с 15 по 19 включительно. Фрагмент ДНК, кодирующий совокупность мутантных вариантов полноразмерного гена *argA*, был очищен электрофорезом в агарозном геле и обработан эндонуклеазами *NcoI* (сайт которой включает в себя ATG кодон гена *argA*) и *HindIII*. Данный фрагмент был лигирован с вектором pKK233-2, обработанный теми же эндонуклеазами (схема

Для оценки активности мутантных NAGS клеточные экстракты штамма *E.coli* В3083(argA⁻), несущего рекомбинантные плазмиды, были обогащены осаждением в 80% растворе сульфата аммония. Активность NAGS оценивали в реакции биосинтеза N-ацетилглутамата в присутствии 5 мМ L-аргинина и в его отсутствии. Было показано (табл. 1), что специфические активности мутантов NAGS-r11 и NAGS-r13 более чем в 2,5 раза превышают активность NAGS-wt при отсутствии его ингибирования. Плазмиды из этих клонов были выделены, и нуклеотидная последовательность гена *argA* была определена секвенированием по методу Сэнгера. Специфическая активность других мутантов NAGS-rN (колонии которых имели одинаковый размер по сравнению с колониями штамма TG1 (pKKArgA-wt)) была существенно ниже активности фермента дикого типа в неингибированном состоянии. Фермент NAGS-4 (содержащий единственную замену Tyr19Cys и описанный как наиболее активный вариант (Rajagopal et al., 1998)) был сконструирован нами посредством сайт-специфического мутагенеза и имел существенно более низкую активность, чем фермент дикого типа.

Таблица 1. Удельная активность мутантных NAGS в грубых клеточных лизатах.			
№ клона	Аминокислотная последовательность рандомизированного фрагмента NAGS	Удельная активность (нмоль мг ⁻¹ мин ⁻¹)	Относ. удельная активность* (%)
wt	-His-Ser-Val-Pro-Tyr-	1200±28	<10
4	-His-Ser-Val-Pro-Cys-	300±11	91
r11	-Val-Val-Trp-Arg-Ala-	3390±75	103
r12	-Leu-Phe-Gly-Leu-His-	1220±34	100
r13	-Ser-Ala-Ala-Ser-Arg-	3120±82	107

* Определялась как отношение удельных активностей фермента в присутствии 5 мМ L-аргинина и в его отсутствии.

В присутствии 5 мМ L-аргинина уровень активности мутантных ферментов не изменялся, в то время как фермент дикого типа существенно ингибировался аргинином (остаточная активность менее 1/10). Таким образом, применение метода комбинаторного мутагенеза позволило в данном случае отобрать *fbr* варианты целевого белка путем анализа менее чем 0,2% от числа теоретически возможных вариантов при заданном уровне рандомизации.

2.3. Очистка и кинетические свойства мутантных NAGS.

Анализ профиля белков грубых клеточных лизатов полученных плазмидных штаммов выявил существенные различия в количестве синтезированных рекомбинантных NAGS (рис. 3). Это явление могло быть следствием множества причин: разной

стабильностью мРНК при транскрипции мутантных вариантов гена или эффективностью трансляции этой мРНК (все мутации находятся в 5'-области гена), а так же разной чувствительностью полученных вариантов NAGS к протеолитической деградации. Поэтому для корректного сравнения кинетических параметров сконструированных ферментов было необходимо провести их исследование с использованием высокоочищенных белковых препаратов.

Fbr варианты мутантной N-ацетилглутамат синтетазы NAGS-r11, NAGS-r13, NAGS-4 и wt были очищены как описано в Материалах и методах. Чистота препаратов белка NAGS-4, как и NAGS-r11, составляла около 70%, а чистота NAGS-wt и NAGS-r13 – около 90%.

На рис. 4 представлена электрофореграмма образцов очищенных препаратов модифицированных вариантов NAGS-r11 и NAGS-r13. Видно, что белок NAGS-r11 представлен на электрофорезном геле двумя зонами (~50 кДа и ~48 кДа), что может свидетельствовать о его большей чувствительности к протеолизу в клетках *E.coli* по сравнению с NAGS-r13, представленного одной зоной (~50 кДа). Следовательно, можно предположить существование сайта расщепления протеазой (протеазами) на

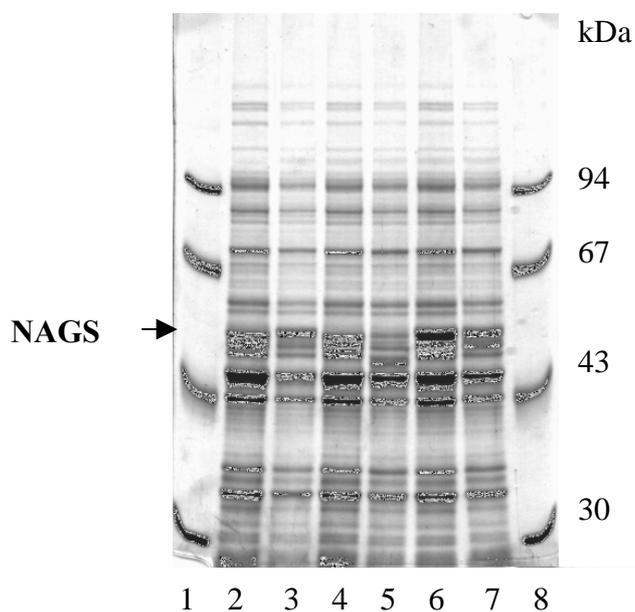


Рисунок 3. SDS-электрофорезный гель штаммов, содержащих мутантные белки NAGS: 2 - pKKargA-wt, неиндуцированная культура; 3 - pKKargA-wt; 4 - pKKargA-r11; 5 - pKKargA-r12; 6 - pKKargA-r13; 7 - pKKargA-r4; 3-7 – культуры индуцировали 1мМ IPTG; 1, 8 – белковый маркер.

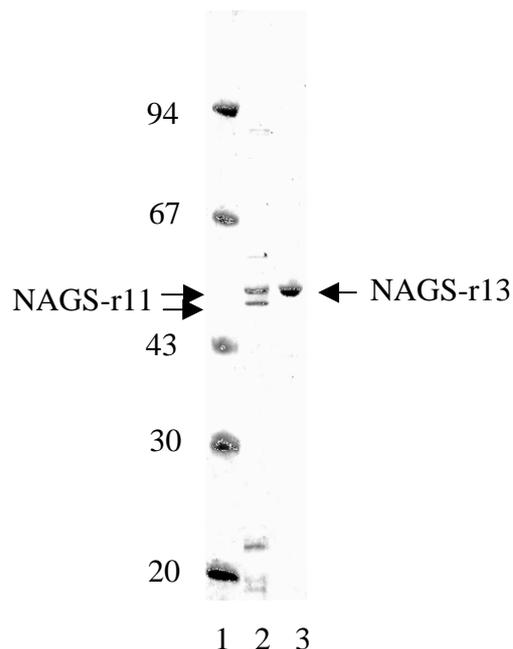


Рисунок 4. SDS-электрофорезный гель очищенных препаратов белков: 2 - NAGS-r11; 3 - NAGS-r13; 1 – белковый маркер.

N-конце аминокислотной последовательности белка, сформированной в результате мутагенеза.

Величины $K_{M \text{ каж}}$ и $V_{\text{max каж}}$ для трех мутантных ферментов и белка дикого типа были определены по кривым насыщения для L-глутамата и ацетил-СоА, которые были приведены методом наименьших квадратов к уравнению Михаэлиса-Ментена. Разделение компонентов реакции и измерение количества синтезированного N-ацетилглутамата было осуществлено посредством капиллярного электрофореза, все измерения проводились независимо, не менее 4-х раз.

Таблица 2. Кинетические свойства вариантов фермента NAGS.

Белок	Субстрат: L-глутамат			Субстрат: ацетил-СоА		
	Glu $K_{M \text{ каж}}$ мМ	$V_{\text{max каж}}$ МКМОЛЬ МГ ⁻¹ МИН ⁻¹	$\times 10^3$, k_{cat}/K_M С ⁻¹ М ⁻¹	AcCoA $K_{M \text{ каж}}$ мМ	$V_{\text{max каж}}$ МКМОЛЬ МГ ⁻¹ МИН ⁻¹	$\times 10^3$, k_{cat}/K_M С ⁻¹ М ⁻¹
NAGS-wt	3,0 ± 0,6	37 ± 3	10,2	2,5 ± 0,5	47 ± 5	15,6
NAGS-4	8,4 ± 1,1	50 ± 3	4,9	0,70 ± 0,08	35 ± 3	41,5
NAGS-r11	3,7 ± 0,5	115 ± 5	25,8	0,32 ± 0,02	111 ± 12	287,9
NAGS-r13	9,5 ± 1,3	139 ± 10	12,1	0,69 ± 0,07	120 ± 10	144,3

Из классической теории кинетики односубстратной реакции следует, что при низких концентрациях субстрата произведение его концентрации на величину k_{cat}/K_M определяет удельную активность фермента. В случае рассматриваемой в данной работе двух-субстратной реакции, аналогичные отношения кажущихся констант для одного субстрата (например – ацетил-СоА) можно также рассматривать в качестве характеристики специфической активности NAGS при низких концентрациях этого субстрата (ацетил-СоА) и насыщающих концентрациях второго субстрата (глутамата) и наоборот. Таким образом, сравнивая значения отношений k_{cat}/K_M для разных ферментов и разных субстратов, можно приблизительно оценить относительную эффективность работы мутантных белков в условиях недостатка каждого субстрата.

Из данных таблицы 2 следует, что в условиях низких концентраций глутамата вариант NAGS-4 в два раза менее эффективен, чем фермент дикого типа, который, в свою очередь, в два с половиной раза менее эффективен, чем вариант NAGS-r11. В случае ацетил-СоА, разница между значениями k_{cat}/K_M для фермента NAGS дикого типа и его вариантами NAGS-r13 и NAGS-r11 еще более велика и составляет уже один порядок. Интересно отметить, что существует определенная корреляция между изменениями кинетических параметров мутантных вариантов NAGS. Действительно, легко заметить, что все полученные модификации (включая единичную замену) приводят к увеличению величины K_M^{Glu} для глутамата с одновременным увеличением сродства к ацетил-СоА (уменьшение K_M^{AcCoA}) и увеличению каталитической константы. Таким образом, можно предположить, что аминокислотные остатки 15 по

19 включительно принимают непосредственное участие в формировании активного центра NAGS. Полученные результаты наглядно свидетельствуют об эвристической ценности комбинаторного метода.

Было исследовано влияние L-аргинина на скорость синтеза N-ацетилглутамата для четырех различных мутантов NAGS. Аргинин является сильным ингибитором (концентрация, необходимая для ингибирования активности фермента на 50%

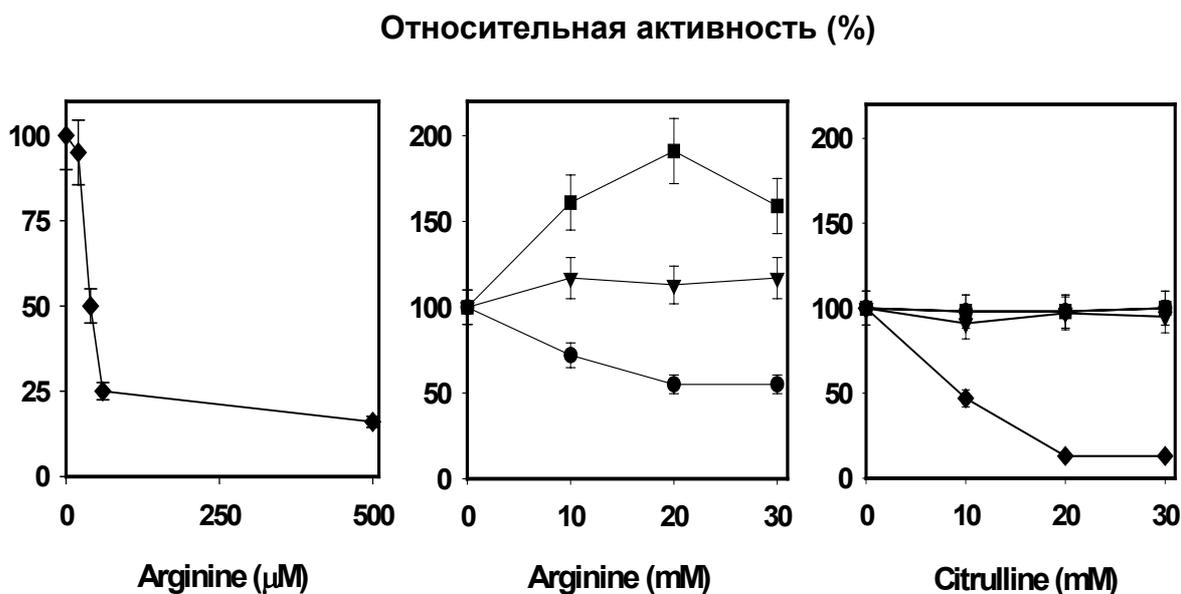


Рисунок 5. Ингибирование NAGS аргинином (А - NAGS-wt(◆); В - NAGS-4(●), NAGS-r11(▼), NAGS-r13(■)) и цитруллином (С). Реакции были проведены в присутствии 5мМ ацетил-СоА и 20 мМ глутамата.

составляет $[I_{0.5}] = 25$ мкМ) для белка дикого типа (рис. 5,А). Для мутанта с единичной заменой NAGS-4 величина $I_{0.5}$ примерно на три порядка выше (около 30 мМ) (рис. 5,В). У мутанта с пятью аминокислотными заменами NAGS-r13 мы обнаружили увеличение активности в присутствии аргинина, как происходит в случае NAGS эукариотов (клетки мышей или человека (Caldovic et al., 2003)). В отличие от *E.coli*, где NAGS абсолютно необходим для обеспечения синтеза аргинина, в клетках млекопитающих единственная известная его функция – это снабжение митохондриальной карбамоилфосфат синтетазы необходимыми ей кофакторами. NAGS *E.coli* и млекопитающих, скорее всего, возникли независимо в процессе эволюции, так как имеют слабую гомологию (Caldovic et al., 2002), поэтому полученный результат показался нам довольно неожиданным.

В случае цитруллина $I_{0.5}$ для NAGS wt составляет около 10 мМ, но этот интермедиат биосинтеза аргинина вообще не влияет на активность мутантных ферментов NAGS (рис. 5,С).

Таким образом, нами было показано, что: 1) введение случайных мутаций в область 15–19 а.о. фермента NAGS привело к образованию мутантов, кинетические параметры которых колеблются в широких пределах (K_M для различных субстратов у полученных мутантов изменяется в 3 и более раза по сравнению с соответствующим параметром для фермента дикого типа); 2) мутанты в различной степени подвержены протеолизу, что позволяет предположить возникновение протеолитического сайта в N-концевом участке фермента; 3) применение метода комбинаторного мутагенеза позволило получить высокоактивные мутанты NAGS, активность которых в присутствии аргинина не уменьшается, а в одном случае увеличивается в 2 раза.

2.4. Применение полученных *fbr*-мутантов NAGS в процессе создания штамма-продуцента аргинина.

Таблица 3. Синтез аргинина в штамме B7925, несущем рекомбинантные плазмиды.		
Плазмида	A550, о.е.	Концентрация аргинина, г/л
pMW119	23,2	4,7
pMADS4	22,4	8,7
pMADS11	19,0	10,0
pMADS12	18,5	7,6
pMADS13	18,1	9,1

Так как ацетилирование глутамата является ключевой стадией биосинтеза аргинина, мы использовали сконструированные *fbr* мутанты фермента NAGS в штамме-продуценте аргинина B7925 (*ilvA*::Tn5, *argR*). Данный штамм содержит точечную мутацию в гене *argR* (Gly123Asp), что приводит к его инактивации, и, следовательно, к активированию всего пути биосинтеза аргинина. Последовательности ДНК, содержащие мутантные гены NAGS-r4, 11, 12 и 13 под контролем *trc* промотора, были клонированы в малокопийный вектор pMW119, используя сайты расщепления рестриктаз *Bam*HI и *Hind*III. Введение рекомбинантной плазмиды, содержащей ген мутантного фермента ArgA-r13, позволило повысить уровень продукции аргинина в 2 раза по сравнению с родительским штаммом (табл. 3) и на 15% по сравнению со штаммом, экспрессирующим ген мутантного белка с единственной аминокислотной заменой.

3. Применение метода комбинаторного мутагенеза для изменения аллостерической регуляции карбамоилфосфат синтетазы из *E. coli*.

Вторым объектом нашего исследования стала CPSase из *E. coli*, являющаяся ключевым ферментом сразу для двух путей биосинтеза – аргинина и пиримидинов.

Этот фермент представляет собой гетеродимер, состоящий из малой (41270 Да) и большой (117710 Да) субъединиц, которые кодируются генами *carA* и *carB*, соответственно. Малая субъединица фермента катализирует гидролиз глутамина и ответственна за перемещение NH_3 к большой субъединице, где и происходит синтез карбамоилфосфата (СР). Большая субъединица содержит сайты связывания для иона бикарбоната, аммония, два различных сайта для Mg-АТР и карбокситерминальный участок (18 кДа), который представляет собой регуляторный домен. Этот домен (D домен) отвечает за связывание с аллостерическими регуляторами IMP, UMP и орнитинном и расположен около СР-синтезирующего активного центра и канала карбамата (Thoden et al., 1997). Ранее была определена единичная замена в аминокислотной последовательности большой субъединицы CPSase (Ser948Phe), которая приводила к появлению *fbr* фенотипа, однако существенно снижала активность фермента (Delannay et al., 1999). Как и в случае с NAGS, целью нашей работы было получение высокоактивного *fbr* мутанта CPSase методом комбинаторного мутагенеза.

3.1. Конструирование библиотеки мутантных генов *carB*.

Процесс конструирования библиотеки мутантных генов *carB* проходил аналогично конструированию совокупности мутантных генов *argA*. В качестве матрицы была использована плаزمида pBScarAB-13, а в качестве праймеров - P1: 5'-ggctgctgctgNN(T/C)N(T/C)CNN(T/C)NNN(G/A)NNggcgataaagaacgcgtggtg-3', частично комплементарный последовательности гена *carB*, P2 - прямой праймер M13 и P3: 5'-ссacttcctcgatgacgcgg-3', гомологичный 5'-концу гена *carB*.

Частичная рандомизация 15-нуклеотидного фрагмента гена *carB*, кодирующего регион от Leu947 до Glu951 аминокислотного остатка, дает набор 4^{12} или около 1.5×10^7 различных последовательностей ДНК, которые могут кодировать 4×10^5 различных вариантов последовательностей аминокислотных остатков в 5-мерном пептиде, и, следовательно, приводит к образованию около 400 000 вариантов мутантных CPSases.

Фрагмент ДНК, кодирующий совокупность мутантных вариантов 3'-концевого фрагмента гена *carB*, был очищен электрофорезом в агарозном геле, обработан рестриктазами *AflIII* и *SacI*, и лигирован с вектором pEL-carAB-wt/*AflIII-SacI*. Схема получения плазмиды pEL-carAB-wt показана на рисунке 6. Около 500 нг лигазной смеси pEL-carAB-NN использовали для трансформации клеток *E.coli* штамма TG1, что приводило к образованию около 10^4 рекомбинантных клонов.

3.2 Селекция *fbr* мутантов CPSase.

Для отбора клонов, продуцирующих активные варианты CPSase, совокупностью рекомбинантных плазмид pEL-carAB-NN трансформировали клетки *E.coli* штамма

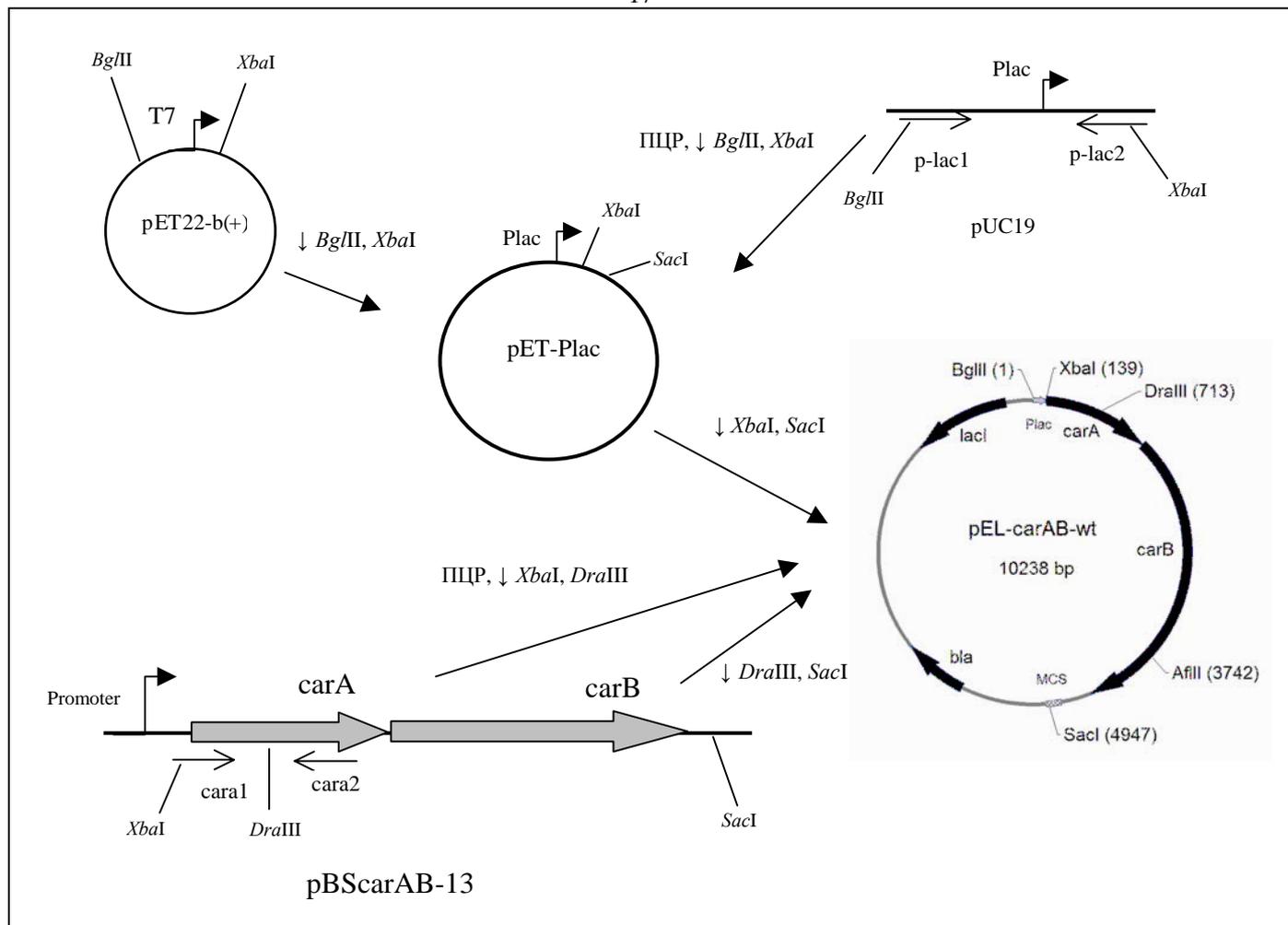
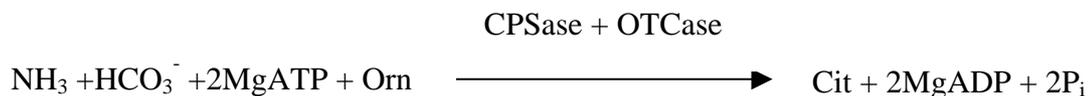


Рисунок 6. Схема конструирования плазмиды pEL-carAB-wt.

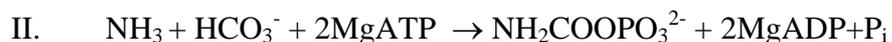
V6969(*carB*::Tn10). На первом этапе селекции трансформационную смесь высевали на чашки с агаризованной средой M9. В результате была выявлена группа хорошо растущих рекомбинантных клонов, 50 из которых использовали для второго этапа селекции. Активность мутантных ферментов была оценена с использованием реакции биосинтеза цитруллина из орнитина, катализируемой совместно CPSase и OTCase (ArgI) в соответствии со следующей схемой:



В качестве источника аммония в реакции использовали $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, ферментативную активность CPSase и их устойчивость к ретроингибированию UMP оценивали по уровню синтеза цитруллина, измеряемого с помощью тонкослойной хроматографии. Так как практически все полученные мутанты обладали высокой устойчивостью к ретроингибированию, для дальнейшего изучения были отобраны клоны, продуцирующие ферменты с наиболее высокой активностью. Фермент CPSase-6 (содержащий единственную замену Ser948Phe и описанный как несущий *fbr* фенотип

(Delannay et al., 1999)) был сконструирован нами посредством сайт-специфического мутагенеза и имел существенно более низкую активность, чем фермент дикого типа.

На следующем этапе активности 10 мутантных ферментов оценивали в реакции синтеза CP из глутамина или аммония в соответствии со следующими схемами реакций:



Для проведения реакций использовали клеточные экстракты, обогащенные осаждением в 80% растворе сульфата аммония. Измерение количеств синтезированного CP проводили с помощью капиллярного электрофореза (табл. 4). Серия реакций I была проведена также в присутствии 10 мМ UTP для определения уровня ретроингибирования ферментов. Из соответствующих клонов были выделены рекомбинантные плазмиды, последовательности генов *carB* определены секвенированием по методу Сэнгера.

Таблица 4. Активность мутантных белков CPSase.				
Клон	Последовательность рандомизированного участка белка CarB (947→951 а.о.)	Активность, количество синтезированного CP, нмоль · мг ⁻¹ · мин ⁻¹ , в присутствии различных субстратов		
		5 мМ Gln	5 мМ Gln; аллостерический регулятор: 10 мМ UMP	200 мМ (NH ₄) ₂ SO ₄
wt	-Leu-Ser-Val-Arg-Glu-	4200 (100%) [*]	520 (12%) ^{**}	1390 (33%) ^{***}
6	-Leu- Phe -Val-Arg-Glu-	930 (22%)	930 (100%)	640 (68%)
10	-Pro-Leu-Arg-Glu-Gly-	2160 (51%)	2160 (100%)	670 (31%)
12	-Ala-Val-Ala-Leu-Lys-	1710 (41%)	1710 (100%)	280 (16%)
13	-Gly-Val-Phe-Leu-Met-	1540 (37%)	1540 (100%)	180 (12%)
27	-Phe-Phe-Cys-Phe-Gly-	2350 (56%)	2350 (100%)	1260 (53%)
31	-Pro-Thr-Gly-Arg-Arg-	4550 (108%)	3300 (73%)	1480 (32%)
33	-Phe-Ala-Cys-Gly-Val-	2000 (48%)	2000 (100%)	820 (41%)
34	-Val-Phe-Gly-Ser-Ser-	2900 (69%)	2900 (100%)	1200 (42%)
36	-Ala-Ser-Gly-Val-Glu-	1170 (28%)	1170 (100%)	270 (23%)
37	-Ala-Phe-Cys-Gly-Val-	1700 (40%)	1700 (100%)	720 (43%)

^{*} В скобках приведена активность в % от активности wt CPSase.
^{**} В скобках приведена активность в % от активности фермента в отсутствие UMP.
^{***} В скобках приведена активность в % от активности фермента в присутствии 5мМ Gln как субстрата.

Из представленных данных можно заключить, что: 1) фермент CPSase, содержащий единичную мутацию Ser948Phe, практически нечувствителен к UMP, но активность этого фермента существенно ниже активности фермента дикого типа (приблизительно в 4 раза с использованием в качестве источника аммония глутамина и в 2 раза с использованием (NH₄)₂SO₄); 2) мутанты CPSase с множественными

заменами в регионе 947-951 а.о. обладают *fbr*-фенотипом и имеют различные уровни ферментативной активности, вплоть до уровня активности CPSase wt. Наиболее высокой активностью обладает мутант 31, содержащий три неконсервативные замены Leu947Pro, Val949Gly, Glu951Arg, одну консервативную замену Ser948Thr и сохранивший в положении 950 остаток Arg. Активность этого фермента составляет около 108% от активности фермента wt и уменьшается до 73% от первоначальной в присутствии 10 мМ UMP (при этих условиях активность CPSase wt составляет ~12% от первоначальной (табл. 4)).

Другие полученные варианты CPSase были полностью нечувствительны к использованной концентрации UMP, но их специфическая активность была в 2 – 4 раза меньше, чем активность фермента дикого типа. Более того, введение различных мутаций в район 947-951 а.о. в определенной степени изменяло субстратную специфичность мутантных белков к источникам аммония. Уровень синтеза CP мутантными CPSase при замене 5 мМ Gln как источника аммония на 200 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ снижался в 2 – 7 раз в зависимости от последовательности аминокислотных остатков в участке 947-951 а.о. мутантного фермента. Эти данные также показывают, что несмотря на некоторое изменение сродства к свободному аммиаку у разных вариантов CPSase, ферменты используют его в качестве субстрата в среднем примерно на два порядка менее эффективно, чем глутамин.

Хотя присутствие мутаций может влиять на устойчивость белка к деградации клеточными протеазами (как произошло с мутантом NAGS-r11), мутации в районе 947-951 а.о. в анализированных препаратах CarB не приводят к существенному изменению концентрации этого белка в клеточных экстрактах (данные не представлены).

Селекция среди множества вариантов, несущих замены аминокислотных остатков в непосредственной близости от ранее идентифицированной мутации Ser948Phe, позволила отобрать варианты мутантных белков, обладающих высокой активностью и сохраняющих *fbr* фенотип. Кроме того, полученные результаты свидетельствуют, что фрагмент белка от 947 до 951-го аминокислотного остатка ответственен не только за ингибирование активности CPSase UMP и уровень ее каталитической активности, но мутации в этом регионе приводят также к определенному изменению субстратной специфичности белка (к глутамину или аммонию).

В данном случае, применение метода комбинаторного мутагенеза позволило отобрать высокоактивные *fbr* мутанты целевого белка путем анализа около 2,5% от числа теоретически возможных вариантов при заданном уровне рандомизации. Полученные белки значительно превосходили по каталитическим свойствам известный ранее мутант Ser948Phe, были полностью нечувствительны к ингибированию UMP, а

уровень их специфической активности был близок к уровню активности CPSase дикого типа.

3.3. Применение полученных *fbr*-мутантов CPSase в процессе конструирования штамма-продуцента оротовой кислоты.

Синтез CP является ключевой стадией для биосинтеза пиримидиновых нуклеотидов и аргинина. Для демонстрации возможности использования *fbr*-мутанта CPSase-34, нами был выбран модельный штамм B8085. Данный штамм, устойчивый к аналогу пиримидиновых нуклеотидов, 6-азаурацилу (1 мг/мл), был получен методом мутагенеза нитрозогуанидином из штамма *E.coli* K12 *argA::Tn10*. Как правило, устойчивость к 6-азаурацилу приводит, с одной стороны, к появлению мутантов со снятым ретроингибированием ферментов пути биосинтеза пиримидинов, а с другой - к усилению транспорта этих веществ из клетки. В свою очередь, инактивация гена *argA* дает возможность использовать весь синтезированный CP для их биосинтеза.

Таблица 5. Синтез оротовой кислоты в штамме B8085, несущем рекомбинантные плазмиды.		
Плаزمида	A550, о.е.	Концентрация оротовой кислоты, г/л
pMW119	13,1	0,12
pMW-CarAB-wt	11,4	0,27
pMW-CarAB-34	12,6	0,66

Введение десенсibilизированного мутанта CPSase-34 привело к существенному повышению уровня продукции целевого вещества (табл. 5).

Так как оротовая кислота является прямым предшественником пиримидиновых нуклеотидов, входящих в состав нуклеиновых кислот, ее соли рассматриваются, как вещество анаболического действия и применяются в фармацевтике при нарушениях белкового обмена как общие стимуляторы обменных процессов (*Стенура и соавт.*, 2002; *Classen*, 2004). Обычно применяют калиевую или магниевую соли оротовой кислоты в сочетании с другими средствами (витаминами и др.) при заболеваниях печени, дистрофии миокарда, прогрессирующей мышечной дистрофии. Калия оротат применяют также для улучшения анаболических процессов при напряженных физических нагрузках.

В свете этих данных штамм-продуцент оротовой кислоты может использоваться не только как родительский штамм при создании продуцентов пиримидиновых нуклеотидов, но и иметь самостоятельное практическое значение для микробиологической промышленности.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что метод комбинаторного мутагенеза с использованием рандомизированных олигонуклеотидов позволяет решить задачу конструирования высокоактивных ферментов биосинтеза аминокислот, устойчивых к ретроингибированию.
2. Сконструированы устойчивые к ингибированию аргинином мутанты N-ацетилглутамат синтетазы (NAGS) *E.coli*, характеризующиеся более высокой каталитической эффективностью по сравнению с исходным ферментом NAGS: для глутамата отношение k_{cat}/K_M увеличено в 2 раза, для ацетил-CoA – в 15 раз.
3. Экспрессия мутантных генов NAGS в штамме-продуценте B7925 обеспечила увеличение биосинтеза аргинина в 2 раза по сравнению с родительским штаммом. Тем самым показана перспективность использования данных мутантов для конструирования промышленных штаммов-продуцентов аргинина.
4. Сконструированы мутанты карбамоилфосфат синтетазы (CPSase) *E.coli* устойчивые к ингибированию UMP, обладающие высокой удельной активностью, сравнимой с активностью исходного фермента.
5. Экспрессия мутантных генов CPSase в штамме-продуценте B8085 приводит к существенному увеличению синтеза оротовой кислоты, что может представлять практический интерес для микробиологического производства как самой оротовой кислоты, так и пиримидиновых нуклеотидов.

Результаты диссертации изложены в следующих публикациях:

- Смирнов С.В., **Котлярова В.А.**, Альтман И.Б., Птицын Л.Р. «Получение мутантов карбамоилфосфат синтетазы *Escherichia coli* методом мутагенеза «рандомизированными» олигонуклеотидами». Биотехнология, 2006, №1, 3-11.
- Смирнов С.В., **Котлярова В.А.**, Альтман И.Б., Птицын Л.Р. «Получение новых мутантов карбамоилфосфат синтетазы *Escherichia coli* методом мутагенеза «рандомизированными» олигонуклеотидами». Тезисы докладов III Московского международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития», 2005, с. 316-317.
- L. R. Ptitsyn, S. V. Smirnov, **V. A. Kotlyarova** and I. B. Altman. «Random oligonucleotide mutagenesis of *Escherichia coli* argA gene and selection of high active n-acetylglutamate synthetase mutants». FEBS Journal, 2005, Vol. 272, p. 515.
- Птицын Л.Р., Смирнов С.В., Альтман И.Б., Новикова А.Е., **Котлярова В.А.**, Гусятинер М.М., Ростова Ю.Г., Ямпольская Т.А. «Новая мутантная карбамоилфосфат синтетаза и способ получения соединений - производных карбамоилфосфата». Патентная заявка РФ №2001121697, дата приоритета 03.08.2001. (US2003129708, JP2003093083)