

УДК 577.113.6, 577.151.4

## РОЛЬ ОСТАТКА R65 В СТАБИЛИЗАЦИИ $\beta$ -ЛАКТАМАЗ ТЕМ-ТИПА С ЗАМЕНОЙ M182T

В.Г. Григоренко\*, И.П. Андреева, О.В. Серова, М.Ю. Рубцова, А.М. Егоров

*(Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, кафедра химической энзимологии; \*e-mail: vitaly.grigorenko@gmail.com)*

Для экспериментального изучения роли остатка R65 в стабилизации  $\beta$ -лактамаз с заменой M182T, предсказанной на основе анализа сетей внутрибелковых взаимодействий, получены гомогенные препараты рекомбинантных  $\beta$ -лактамаз ТЕМ-типа с заменами R65L, M182A и комбинацией мутаций R65L и M182T. Определены кинетические параметры данных ферментов по таким субстратам, как пенициллин, цефтазидим, цефалотин и СЕНТА. Показано, что все исследованные замены не изменяют субстратную специфичность ферментов в отношении  $\beta$ -лактамных антибиотиков. Замена R65L приводит к уменьшению термостабильности, замена M182A и сочетание замен R65L и M182T приводит к увеличению термостабильности  $\beta$ -лактамазы по сравнению с ферментом дикого типа ТЕМ-1. Методом дифференциально сканирующей калориметрии определены энтальпия ( $\Delta H$ , кДж/моль) и температура денатурации ( $T_{пл.}$ , °С) для  $\beta$ -лактамаз ТЕМ-1, ТЕМ(M182A), ТЕМ-135(M182T), ТЕМ(R65L+M182T), которые составляют соответственно 554,0 и 50,8; 573,7 и 51,7 кДж/моль; 654,4 и 55,9; 647,4 и 51,9 °С. Полученные данные дополняют представления о молекулярном механизме стабилизирующей роли мутации M182T, заключающейся в изменении конформации остатка R65 и возникновении его новых контактов с остатками  $\Omega$ -петли  $\beta$ -лактамазы.

**Ключевые слова:** рекомбинантные  $\beta$ -лактамазы ТЕМ-типа, мутации, термостабильность, сети внутрибелковых взаимодействий.

Феномен устойчивости бактерий к антибиотикам был обнаружен еще до начала их широкого использования в клинической практике. К настоящему времени распространенность резистентных к антибиотикам бактерий (возбудителей инфекционных заболеваний) достигла угрожающего уровня и представляет серьезную угрозу для человека [1–2]. Проблему усугубляют длительность времени разработки и высокая стоимость новых антибактериальных препаратов [3]. Согласно отчету Transparency Market Research,  $\beta$ -лактамные антибиотики – наиболее широко используемый класс соединений для лечения бактериальных инфекций, на их долю приходится около 60% мирового рынка антибактериальных препаратов [4]. Наиболее распространенный механизм возникновения устойчивости грамотрицательных бактерий к  $\beta$ -лактамным антибиотикам обусловлен образованием ферментов  $\beta$ -лактамаз, гидролизующих  $\beta$ -лактамное кольцо антибиотика, в результате чего он теряет свою антимикробную активность [5, 6].

Наиболее распространены сериновые  $\beta$ -лактамазы молекулярного класса А, относящиеся к типам ТЕМ, SHV, CTX-M, и KPC [5]. Из них наибольшую клиническую угрозу пред-

ставляют  $\beta$ -лактамазы расширенного спектра (БЛРС), которые гидролизуют как пенициллины, так и цефалоспорины I–IV поколений [7]. Из литературы известно, что эволюция  $\beta$ -лактамаз развивается по двум основным механизмам: возникновение новых мутаций у известных ферментов и появление ферментов с новой структурой. Описано несколько мутаций  $\beta$ -лактамаз, получивших название «ключевых», которые способствуют расширению спектра субстратной специфичности, изменению каталитической активности и возникновению устойчивости к ингибиторам. Эти ключевые мутации составляют не более 10% от всех выявленных мутаций в  $\beta$ -лактамазах, большинство из них расположены близко к активному центру. Мутации остальных остатков называют вторичными или сопутствующими.

$\beta$ -Лактамаза ТЕМ-1 стала первым ферментом семейства, выделенным из крови инфицированного пациента в начале 1960-х годов [8]. Это модельный фермент для изучения влияния различных мутаций на ферментативную активность. К настоящему времени описаны более 200 мутантных форм этого фермента. В Protein Data Bank представлены более 60 структур различных

$\beta$ -лактамаз TEM-типа в комплексе с молекулами лекарственных средств и ингибиторов в разном разрешении [9–11]. Анализ кристаллических структур мутантных форм  $\beta$ -лактамаз показал, что точечные мутации остатков, расположенных вблизи активного центра, приводят к структурным изменениям, в частности, они существенно изменяют конфигурацию петель активного центра. Это приводит к изменениям каталитической активности и субстратной специфичности ферментов [12–14]. Влияние вторичных мутаций остатков, удаленных от активного центра и расположенных на периферийной части белковой глобулы, до сих пор плохо изучено. Исключения представляют  $\beta$ -лактамазы с единичной мутацией M182T и ее комбинацией с ключевыми мутациями. Для этих ферментов установлено стабилизирующее влияние такой замены, заключающееся в компенсации дефектов ферментативной стабильности, вызванных ключевыми мутациями [10, 15]. Однако детальный молекулярный механизм компенсаторного эффекта данной мутации пока не установлен. Для изучения механизмов влияния мутаций  $\beta$ -лактамаз на стабильность белковой глобулы и ее элементов был предложен метод построения сетей внутрибелковых взаимодействий RINs (Residue Interaction Networks) на основе анализа траекторий молекулярной динамики [16]. При построении сетей RINs для  $\beta$ -лактамаз с заменой M182T выявлено перераспределение внутрибелковых контактов от остатка 182 до остатков  $\Omega$ -петли (важного структурного элемента сериновых  $\beta$ -лактамаз), включающей остатки от R164 до D179 и расположенной у входа в активный центр. Ключевую роль в изменении сети контактов аминокислотных остатков, предположительно, играет остаток R65.

Цель данной работы – экспериментальное изучение роли остатка R65 в стабилизирующем влиянии замены M182T у  $\beta$ -лактамаз TEM-типа. Для этого были получены и исследованы рекомбинантные  $\beta$ -лактамазы TEM-1, имеющие единичные замены R65L, M182A и комбинацию замен R65L и M182T.

### Экспериментальная часть

В работе использовали реагенты производства «Sigma-Aldrich» (<http://www.sigmaaldrich.com>), Difco (<http://www.bd.com>). Для работы с ДНК использованы наборы QIA Spin Miniprep Kit и QIAquick Gel extraction Kit (<https://www.qiagen.com>). Использовали ферменты

рестрикции и модификации ДНК производства «New England Biolabs» (<https://www.neb.com>), «Thermo Fisher Scientific» (<https://www.thermofisher.com>). Синтез олигонуклеотидов для секвенирования и ПЦР осуществлялся в компании «Синтол» (<https://www.syntol.ru>). Секвенирование ДНК проводили в компании «Евроген» (<http://evrogen.ru>). Для определения концентрации белка использовали ВСА тест-набор («Sigma-Aldrich»); носители для хроматографической очистки SOURCE<sup>TM</sup> 15Q (<http://www.gehealthcare.com>). Все водные растворы готовили на деионизованной воде «Milli-Q» (<http://www.merckmillipore.com>).

**Микроорганизмы, среды, плазмиды и олигонуклеотиды.** Для генетических манипуляций использовали клетки *E. coli* линии DH5 $\alpha$  и плазмидный вектор pET-24, а для экспрессии белка – *E. coli* BL21(DE3) («Novagen», США). Клетки культивировали в среде LB (1,0%-й экстракт дрожжей; 1,0%-й пептон; 0,5%-й NaCl), содержащей 50 мг/л канамицина.

Для получения компетентных клеток *E. coli* культуру наращивали до OD<sub>600</sub> 0,4–0,6 в 50 мл среды LB, клетки отделяли от культуральной среды центрифугированием (3500 g при 4 °C в течение 10 мин). Осадок клеток ресуспендировали на льду в буфере TSS (буфер на основе среды LBS, содержащий на 100 мл 10 г ПЭГ-6000, 5 мл DMSO и 0,6 г MgCl<sub>2</sub>; pH 6,5), выдерживали в течение 1 ч на льду и замораживали при –80 °C.

Поиск нуклеотидных последовательностей генов  $\beta$ -лактамаз осуществляли на сайтах клиники «Lahey» ([www.lahey.org/studies/](http://www.lahey.org/studies/)) и Европейского института биоинформатики ([www.ebi.ac.uk/](http://www.ebi.ac.uk/)). Выравнивание последовательностей  $\beta$ -лактамаз осуществляли с помощью программы Multiple alignment, Multaline DNA (<http://prsa-pbil.ibcp.fr/>). Транслирование нуклеотидной последовательности ДНК в аминокислотную проводили на сервере ExPASy Translate tool (<http://expasy.org/tools/dna.html>). Расчет pI и Mw белка выполняли на этом же сервере ([http://au.expasy.org/tools/pi\\_tool.html](http://au.expasy.org/tools/pi_tool.html)).

**Введение мутаций методом Quick Change.** Амплификацию проводили с использованием Pfu-полимеразы в общем объеме 25 мкл в тонкостенных пробирках (0,2 мл) в ДНК-амплификаторе по следующему протоколу: начальная денатурация при 95 °C (2 мин); 15 циклов амплификации: денатурация при 95 °C (30 с); отжиг праймеров при 55 °C (1 мин); элонгация при 72 °C (7 мин); конечная элонгация при 72 °C (10 мин); охлаждение

смеси до +4 °С. В полученную после ПЦР смесь добавляли рестриктазу DpnI, инкубировали при 37 °С в течение 1 ч и далее использовали для трансформации клеток *E. coli* DH5 $\alpha$ . В качестве матрицы применяли вектор pET-24a(+) с клонированным геном TEM-1  $\beta$ -лактамазы [7, 8].

Для введения мутаций использовали праймеры: R65L

Прямой: 5'-gccccgaagaacttttccaatgatg-3';  
обратный: 5'-catcattggaaaaagtctctcggggc-3';  
M182A

прямой: 5'-gtgacaccacggcgctgcagcaatg-3';  
обратный: 5'-cattgctgcaggcgccgtggtgtcac-3';  
M182T

прямой: 5'-gtgacaccacgacgcctgcagcaatg-3';  
обратный: 5'-cattgctgcaggcgctggtgtcac-3'.

**Культивирование клеток *E. coli*.** Клетки *E. coli* наращивали в среде LB с канамицином (50 мкг/мл). В качестве индуктора использовали ИПТГ. Клетки выращивали при 30 °С, перемешивая (180 об/мин) до значения оптического поглощения 0,8–1,2 ед. при 600 нм, далее индуцировали 0,1 мМ ИПТГ и продолжали культивирование в течение 5 ч. Клетки центрифугировали (3000 г, 4 °С) и хранили при –20 °С.

**Выделение и очистка рекомбинантных мутантных форм  $\beta$ -лактамаз TEM-типа.** Для выделения периплазматической фракции использовали метод осмотического шока. Клетки размораживали на льду и ресуспендировали в буфере, содержащем 20% сахарозы, 1 мМ ЭДТА и 10 мМ Трис/HCL (pH 8,0); инкубировали на льду в течение 15 мин. Образовавшиеся сферопласты удаляли центрифугированием (10 000 г, 4 °С) в течение 15 мин. Полученный супернатант диализовали против 10 мМ Трис/HCL (pH 8,0) и использовали для дальнейшей очистки. На колонке SOURCE<sup>TM</sup> 15Q (10 см  $\times$  0,75 см<sup>2</sup>, «GE Life Science»), уравновешенной тем же буфером, проводили анионо-обменную хроматографию; рекомбинантный препарат фермента элюировали в линейном градиенте (0–300 мМ NaCl, 2 мл/мин). Фракции, содержащие активный фермент, хранили при +4 °С или замораживали при –20 °С. Дополнительная стадия очистки включала проведение гель-фильтрационной хроматографии с использованием колонки Superose® 12 10/300 GL (<https://www.gelifesciences.com>).

**Измерение активности рекомбинантных форм  $\beta$ -лактамаз.** Активность  $\beta$ -лактамазы по субстрату CENTA определяли на спектрофотометре «UV-1602» («Shimadzu», Япония) при 25 °С. Образование хромогенного продукта

детектировали при длине волны 405 нм ( $\Delta\epsilon_{405} = 6400 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) [17]. Активность измеряли в 50 мМ Na-фосфатном буферном растворе (pH 7,0). При измерении активности по нативным субстратам использовали следующие параметры: для пенициллина  $\Delta\epsilon_{233} = 1140 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ; для цефалотина  $\Delta\epsilon_{262} = 7660 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ; для цефтазидима  $\Delta\epsilon_{260} = 10\,500 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  [18–19].

**Определение  $K_m$ ,  $V$  и  $k_{\text{кат}}$ .** Для определения этих параметров 4 мМ раствор субстрата  $\beta$ -лактамазы (CENTA, пенициллин, цефалотин, цефтазидим) в 50 мМ Na-фосфатном буфере (pH 7,0) и аликвоту фермента (10 мкл) добавляли к 50 мМ натрий-фосфатному буферному раствору (pH 7,0). Общий объем смеси составлял 1 мл. Значения начальной скорости ферментативной реакции определяли по начальному линейному участку кинетической кривой накопления продукта при проведении реакции гидролиза ( $k_{\text{кат}} = V/[E_0]$ ). Значения кинетических параметров ( $K_m$ ,  $V$ ) определяли по графикам в координатах Лайнуивера-Берка. При расчетах полагали, что концентрация активных центров ферментов соответствует концентрации фермента в реакционной смеси.

**Изучение термостабильности  $\beta$ -лактамаз** проводили путем выдерживания фермента при 60 °С в течение 3 ч с периодическим отбором аликвот через 10, 20, 30, 60, 90, 120 и 180 мин. Концентрация фермента в 50 мМ натрий-фосфатном буфере (pH 7,0) составляла 0,1 мг/мл. Измерение остаточной активности осуществляли при комнатной температуре. Для исключения возможной сорбции фермента в процессе инкубации измеряли концентрацию белка во всех отобранных аликвотах.

Определение температуры максимальной скорости денатурации ( $T_{\text{пл}}$ , °С) и энтальпии денатурации  $\beta$ -лактамаз TEM-типа методом дифференциально сканирующей калориметрии (ДСК) было выполнено вед. науч. сотр., канд. биол. наук С.Ю. Клейменовым (ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН).

## Результаты и обсуждение

**Периплазматическая экспрессия генов  $\beta$ -лактамаз TEM-типа в клетках *E. coli*.** Полноразмерные гены мутантных форм  $\beta$ -лактамазы TEM-1, содержащих единичные замены R65L, M182A и комбинацию замен R65L и M182T, получали методом экспрессии генов соответствующих ферментов в бактериальную периплазму, поскольку ее окислительный потенциал способствует

формированию стабильных дисульфидных связей. Последовательность генов включала нативную сигнальную последовательность для транспорта синтезированного белка в периплазму. Мутации в ген  $\beta$ -лактамазы дикого типа TEM-1 вводили методом Quick-Change. Гены были клонированы в плазмидный вектор pET-24 под контролем сильного промотора T7 по сайтам рестрикции NdeI и NotI [20]. Секвенирование показало, что ни на одной из стадий клонирования не было введено случайных мутаций. Были созданы три штамма *E. coli* – продуценты соответствующих  $\beta$ -лактамаз. Создание штамма-продуцента рекомбинантной  $\beta$ -лактамазы TEM-135, содержащей единичную замену M182T, описано ранее [21]. Далее были оптимизированы условия культивирования бактериальных клеток, получения их периплазматических фракций и дальнейшей очистки гомогенных рекомбинантных  $\beta$ -лактамаз. Все три изучаемых фермента были получены в активной и растворимой формах. Стоит отметить, что при одинаковых условиях культивирования, индукции, выделения и очистки периплазматические фракции всех полученных  $\beta$ -лактамаз характеризовались примерно одинаковым уровнем экспрессии ре-

комбинантного белка, за исключением мутанта с заменой R65L. У штамма-продуцента данного фермента уровень синтеза целевого зрелого белка без сигнальной последовательности был крайне низким. При этом уровень синтеза белка-предшественника с сигнальной последовательностью был достаточно высоким и сравнимым с уровнями синтеза белков-предшественников других мутантных форм. Можно предположить, что замена R65L влияет на процесс биосинтеза данного фермента в клетке (фолдинг, транслокацию в периплазму, процессинг сигнальной последовательности, протеолиз и др.).

**Определение физико-химических параметров рекомбинантных  $\beta$ -лактамаз TEM типа.** Сравнительное изучение каталитических свойств и термостабильности полученных гомогенных препаратов рекомбинантных  $\beta$ -лактамаз позволило установить индивидуальное влияние единичных аминокислотных замен на свойства ферментов. Значения каталитических параметров рекомбинантных  $\beta$ -лактамаз ( $K_M$ ,  $V$ ,  $k_{кат.}$ ) представлены в табл. 1–3.

Измеренные в настоящей работе величины  $K_M$  и  $k_{кат.}$  для рекомбинантных форм  $\beta$ -лактамаз

Т а б л и ц а 1

**Каталитические параметры мутантных форм  $\beta$ -лактамаз TEM-типа в отношении гидролиза хромогенного субстрата CENTA**

$\beta$ -Лактамаза (база данных <a href="http://www.lahey.org">http://www.lahey.org</a> )	Мутация	$K_M$ , млМ	$V_{макс.}/[E_0]$ , $c^{-1}$	$V_{макс.}/[E_0]/K_M$ , $мкМ^{-1} \cdot c^{-1}$	Остаточная активность, % (3 ч, 60 °C)
TEM-1	–	29 ± 3	109 ± 11	3,7	58 ± 5
TEM-135	M182T	28 ± 3	75 ± 9	2,7	68 ± 7
–	R65L	32 ± 1	29 ± 3	0,9	20 ± 2
–	M182A	24 ± 3	36 ± 3	1,5	57 ± 5
–	R65L+M182T	40 ± 4	23 ± 3	0,6	90 ± 7

Т а б л и ц а 2

**Значение  $K_M$  мутантных форм  $\beta$ -лактамаз TEM-типа в реакции гидролиза пенициллина, цефалотина и цефтазидима**

Антибиотик	$K_M$ , мкМ			
	TEM-1	M182T	R65L	M182A
Пенициллин	75 ± 8	70 ± 8	85 ± 10	70 ± 8
Цефалотин	310 ± 35	330 ± 35	350 ± 35	320 ± 35
Цефтазидим	900 ± 100	970 ± 100	1010 ± 120	960 ± 110

Таблица 3

**Значение  $k_{кат.}$  мутантных форм  $\beta$ -лактамаз TEM-типа в реакции гидролиза пенициллина, цефалотина и цефтазидима**

Антибиотик	$V_{макс.} / [E]_0, 1/c$				
	TEM-1	M182T	R65L	M182A	R65L+M182T
Пенициллин	1280 ± 150	1310 ± 150	960 ± 110	1240 ± 150	960 ± 110
Цефалотин	150 ± 20	140 ± 20	110 ± 15	140 ± 20	110 ± 15
Цефтазидим	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,01	н/д*	0,02 ± 0,01	н/д*

\*н/д – нет данных.

позволяют сделать вывод о схожести каталитических характеристик мутантных ферментов, содержащих замены в положениях 65 и 182 в реакции гидролиза различных субстратов  $\beta$ -лактамаз. Данные замены не приводят к изменению спектра гидролизуемых  $\beta$ -лактамных субстратов. Это свидетельствует о том, что замены R65L, M182A и комбинация замен R65L и M182T не оказывают существенного влияния на конформацию активного центра фермента и пути передачи протона. Во всех случаях при близких значениях  $K_M$  наблюдается падение каталитической эффективности мутантных форм в 2–6 раз по сравнению с ферментом дикого типа TEM-1. Замена остатка метионина в поло-

жении 182 на аланин не привела к изменению каталитических свойств фермента по сравнению с TEM-1 и мутантом M182T.

Изучение термостабильности полученных рекомбинантных мутантных форм  $\beta$ -лактамаз TEM-типа проводили при инкубации ферментов (60 °С, 3 ч), измеряя остаточную каталитическую активность (рис. 1).

Показано, что единичная замена R65L приводит к резкому уменьшению стабильности  $\beta$ -лактамазы по сравнению с ферментом TEM-1. Единичная замена M182A приводит к стабилизации  $\beta$ -лактамазы на уровне, соответствующем самому термостабильному из природных  $\beta$ -лактамаз (TEM-135 с заменой M182T). Рас-

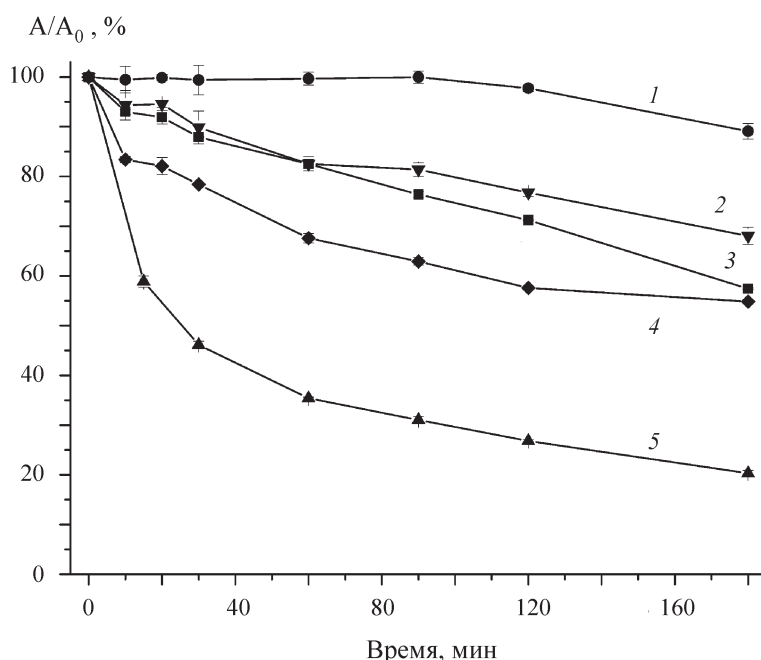


Рис. 1. Зависимость остаточной активности мутантных форм  $\beta$ -лактамаз TEM-типа (1 – M182A + R65L, 2 – M182T, 3 – M182A, 4 – TEM-1, 5 – R65L) от времени. Концентрация ферментов 0,1 мг/мл в 50 мМ натрий-фосфатном буфере (pH 7,0; температура инкубации 60 °С)

хождение между ними наблюдалось лишь при инкубации более 1,5 ч. Двойной мутант с комбинацией замен R65L и M182T имеет самую высокую термостабильность, превышающую показатели  $\beta$ -лактамазы TEM-135. Поскольку мутантная форма  $\beta$ -лактамазы с заменой R65L характеризуется низким уровнем синтеза целевого фермента в клетках *E. coli*, а у фермента с двойной заменой R65L и M182T уровень синтеза соответствует ферменту дикого типа, можно заключить, что мутация M182T компенсирует не только снижение термостабильности белка вследствие замены R65L, но также приводит к восстановлению уровня биосинтеза  $\beta$ -лактамазы в клетках *E. coli*.

Изучение мутантных форм  $\beta$ -лактамаз с заменами в положении 182 методом дифференциально сканирующей калориметрии показало наличие одиночных пиков необратимой денатурации в каждом образце, что свидетельствует о присутствии в каждом белке одного структурного необратимо денатурирующего домена. Значения температуры максимума скорости денатурации и энтальпии денатурации приведены в табл. 4. Температура денатурации мутанта с заменой M182T (55,9 °C) превышала таковую для фермента с заменой M182A (51,7 °C) и фермента с двойной заменой R65L+M182T (51,9 °C). Можно предположить, что схожее поведение этих двух мутантов, которое наблюдается в экспериментах по способности ферментов к обратимой термореактивации, имеет разную природу стабилизации. Ранее аналогичные данные были получены для  $\beta$ -лактамазы с заменой R164S, где способность фермента к обратимой термореактивации не коррелировала с данными по термодинамической стабильности [21]. Этот эффект было пред-

ложено рассматривать с точки зрения влияния соответствующей мутации на энергетический барьер перехода *цис-транс*-конформации пептидил-пролиновой связи E166-P167, которая составляет около 20 ккал/моль [22]. Известно, что только *цис*-конфигурация данной связи соответствует каталитически активной форме фермента.

**Механизм стабилизации  $\beta$ -лактамаз TEM-типа с участием замен остатка M182.** Существующие в настоящее время гипотезы, объясняющие стабилизирующую роль вторичной мутации M182T, рассматривают образование дополнительной водородной связи остатка T182 с аминокислотной группой остатка A185, которые расположены на границе  $\alpha$ -спирали [23], а также образование водородной связи с карбонильной группой основной цепи остатка E64, что, вероятно, усиливает связь  $\alpha$ - и  $\alpha/\beta$ -доменов  $\beta$ -лактамазы [24]. Выполненный нами ранее анализ сетей внутрибелковых взаимодействий, полученных на основе траекторий молекулярной динамики, позволил предположить возможную роль остатка R65 в стабилизации белковой глобулы у  $\beta$ -лактамаз с заменой M182T [16]. Для подтверждения предположений, сделанных на основании молекулярной динамики, в настоящей работе проведено экспериментальное изучение свойств  $\beta$ -лактамаз с единичной (R65L) и двойной (R65L + M182T) заменами. Если механизм действия замены M182T обусловлен только локальной стабилизацией соответствующей  $\alpha$ -спирали, то замена аргинина на лейцин (R65L) не должна влиять на термостабильность фермента. Полученные нами данные свидетельствуют об участии остатка R65 в стабилизации фермента: единичная замена R65L приводит к резкому снижению спо-

Т а б л и ц а 4

**Значения температур максимума скорости денатурации и энтальпии денатурации мутантных форм  $\beta$ -лактамаз TEM-типа, полученных методом дифференциально сканирующей калориметрии. Концентрация ферментов 3 мг/мл, 0,2 М калий-фосфатный буфер (pH 7,0)**

$\beta$ -Лактамаза (база данных <a href="http://www.lahey.org">http://www.lahey.org</a> )	Мутация	$T_{пл}, ^\circ\text{C}$	$H$ , кДж/моль
TEM-1	–	50,8	554,0
–	M182A	51,7	573,7
–	M182T + R65L	51,9	647,4
TEM-135	M182T	55,9	654,4

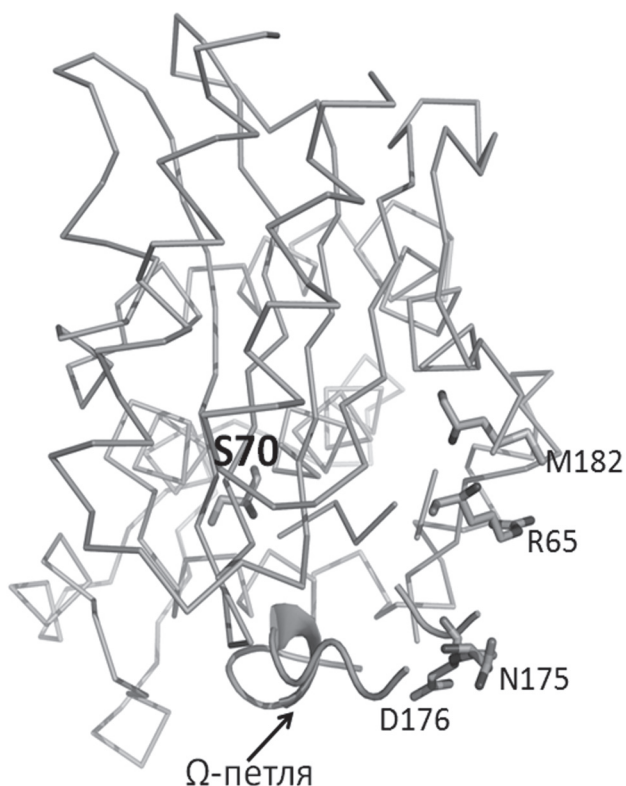


Рис. 2. Третичная структура  $\beta$ -лактамазы TEM-1 (PDB ID 1XPB). Остаток каталитического серина S70 и остатки R65, N175, D176, M182 изображены в стержневом представлении

способности фермента к терморективации, а также к значительному снижению уровня биосинтеза. При комбинации этой замены с мутацией M182T температура денатурации также остается сниженной (51,9 °C) по сравнению с ферментом с единичной заменой M182T (55,9 °C).

Остаток R65L расположен в шарнирном участке  $\beta$ -лактамазы (hinge region, остатки 60–68), соединяющем ее  $\alpha$ - и  $\alpha/\beta$ -домены [25] (рис. 2). Вероятно, дестабилизирующее влияние замены R65L связано с изменением конформации этого шарнирного участка. У мутанта с заменой метионина 182 на аланин отсутствует гидроксильная группа, которая в случае треонина укрепляет  $\alpha$ -спираль, что может привести к снижению термостабильности по сравнению с мутантом M182T. Действительно, мы определили, что температура денатурации мутанта M182A (51,7 °C) ниже, чем у фермента с заменой M182T (55,9 °C), а это аргумент в пользу общепринятого механизма стабилизации. Однако в экспериментах по терморективации замена остатка метионина 182 на аланин приводила к стабилизации фермента, сравнимой с самым термостабильным природным ферментом TEM-135 с заменой M182T. В этом случае можно предпо-

ложить, что небольшая боковая группа аланина ослабляет гидрофобный patch, что способствует изменению конформации остатка R65 и подтверждает данные молекулярной динамики о возможности изменения сети внутрибелковых взаимодействий от остатка T182 до остатков  $\Omega$ -петли при изменении положения остатка R65.

Таким образом, полученные нами данные позволяют дополнить предполагаемый механизм стабилизирующей роли вторичной мутации M182T и связать его с изменением подвижности  $\Omega$ -петли, расположенной у входа в активный центр  $\beta$ -лактамазы. В исходном ферменте TEM-1 остаток M182 располагается на поверхности белковой глобулы и удерживается там за счет гидрофобных взаимодействий с ацильными группами остатков R65, E63 и V159. Замена M182T приводит к тому, что вместо длинной гидрофобной цепи метионина появляется короткая группа остатка треонина, которая при образовании дополнительной водородной связи ориентирована в глубь белковой глобулы. В результате такой конформационной перестройки исходный гидрофобный patch ослабляется, остатки получают большую свободу движения, а остаток R65, изменяя при повышенной темпе-

ратуре свою конформацию, становится способным к образованию новых прочных контактов с остатками  $\Omega$ -петли – N175 и D176 (рис. 2). В результате  $\Omega$ -петля фиксируется в закрытом положении (прижатой к белковой глобуле). Можно предположить, что белок становится более компактным, обладающим более высокой термостабильностью. Поскольку подвижность  $\Omega$ -петли важна для эффективного связывания и гидролиза субстратов  $\beta$ -лактамазы, такое ограничение движения петли влияет на активность фермента, что было продемонстрировано ранее: каталитическая эффективность ( $k_{\text{кат.}}/K_M$ )  $\beta$ -лактамазы с комбинацией замен R164S и M182T была снижена в 3,5 раза по сравнению с ферментами с соответствующими единичными

заменами [21].

Полученные данные позволяют существенно расширить принятую в настоящее время парадигму стабилизирующей роли вторичной мутации M182T, а также показать перспективность применения метода построения сетей внутрибелковых взаимодействий (RINs) для установления и изучения комплексного взаимного влияния единичных и множественных мутаций на структуру и свойства  $\beta$ -лактамаз.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 15-14-00014-П).

Конфликта интересов нет.

Дополнительных материалов нет.

Дополнительной информации нет.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Cassini A, Högberg L.D., Plachouras D., Quattrocchi A., Hoxha A., Simonsen G.S. // *Lancet Infect Dis*. 2019. Vol. 19. P.56.
- Holmes A.H., Moore, L.S.P., Sundsfjord A., Steinbakk M., Regmi S., Karkey A., Piddock L.J.V. // *Lancet*. 2016. Vol. 387. P. 176.
- Carlet J., Collignon P., Goldmann D., Goossens H., Gyssens I.C., Harbarth S., Jarlier V., Levy S.B., N'Doye B., Pittet D., Richtmann R., Seto W.H., Van der Meer J.W., Voss A. // *Lancet*. 2011. Vol. 378. P. 369.
- Antibacterial Drugs Market: Global Industry Analysis, Size, Share, Growth, Trends and Forecast 2015 – 2023. Transparency Market Research. Published Date: 2015-07-01 (<http://www.transparencymarketresearch.com/antibacterial-drugs-market.html>).
- Bush K. // *Antimicrob Agents Chemother*. 2018. Vol. 62. P. 1.
- Bonomo R.A. // *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2017. Vol. 7. P. 1.
- Philippon, A., Slama, P., Dény, P., & Labia, R. // *Clinical Microbiology Reviews*. 2016. Vol. 29. P. 29.
- Datta N., Kontomichalou P. // *Nature*. 1965. Vol. 208. N 5007. P. 239.
- Wang X., Minasov G., Blázquez J., Caselli E., Prati F., Shoichet B.K. // *Biochemistry*. 2003. Vol. 42. N 28. P. 8434.
- Wang X., Minasov G., Shoichet B.K. // *J. Mol. Biol*. 2002. Vol. 320. P. 85.
- Reichmann D., Cohen M., Abramovich R., Dym O., Lim D., Strynadka N.C., Schreiber G. // *J. Mol. Biol*. 2007. Vol. 365. N 3. P. 663.
- Stec B. // *Acta Crystallogr. Sect. D*. 2005. Vol. 61. P. 1072.
- Fonze E. // *Acta Crystallogr. Sect. D*. 1995. Vol. 51. P. 682.
- Eynat D. // *J. Mol. Biol*. 2013. Vol. 425. P. 2609.
- Richman D.D. // *Nature*. 1995. Vol. 374. P. 494.
- Shcherbinin D., Veselovsky A., Rubtsova M., Grigorenko V., Egorov A. // *J. Biomol. Struct. Dyn*. 2019 (DOI: 10.1080/07391102.2019.1634642).
- Bebrone C., Moali C., Mahy F., Rival S., Docquier J.D., Rossolini G.M., Fastrez J., Pratt R.F., Frère J.M., Galleni M. // *Antimicrob. Agents Chemother*. 2001. Vol. 45. N 6. P. 1868.
- Cantu C. 3rd., Huang W., Palzkill T. // *J. Biol. Chem*. 1997. Vol. 272. N 46. P. 29144.
- Stojanovski V., Chow D.C., Hu L., Sankaran B., Gilbert H.F., Prasad B.V., Palzkill T. // *J. Biol. Chem*. 2015. Vol. 290. N 16. P. 10382.
- Grigorenko V.G., Andreeva I.P., Rubtsova M.Yu., Deygen I.M., Antipin R.L., Majouga A.G., Egorov A.M., Beshnova D.A., Kallio J., Hackenberg C., Lamzin V.S. // *Biochimie*. 2017. Vol. 132. P. 45.
- Grigorenko V., Uporov I., Rubtsova M., Andreeva I., Shcherbinin D., Veselovsky A., Serova O., Ulyashova M., Ishtubaev I., Egorov A. // *FEBS Open Bio*. 2017. Vol. 8. N 1. P. 117.
- Andreotti A.H. // *Biochemistry*. 2003. Vol. 42. P. 9515.
- Docquier J.D., Benvenuti M., Calderone V., Rossolini G.M., Mangani S. // *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun*. 2011. Vol. 67. P. 303.
- Farzaneh S., Chaibi E. B., Peduzzi J., Barthelemy M., Labia R., Blazquez J. // *Antimicrob. Agents Chemother*. 1996. Vol. 40. P. 2434.
- Jelsch C., Mourey L., Masson J.M., Samama J.P. // *Proteins*. 1993. Vol. 16. N 4. P. 364.

Поступила в редакцию 10.01.2020  
Получена после доработки 12.01.2020  
Принята к публикации 20.01.2020



**IMPACT OF RESIDUE R65 ON THE STABILIZATION OF TEM-TYPE  $\beta$ -LACTAMASES WITH SUBSTITUTION M182T****V.G. Grigorenko\*, I.P. Andreeva, O.V. Serova, M.Yu. Rubtsova, A.M. Egorov***(M.V. Lomonosov Moscow State University, Chemistry Department, Enzymology Division; \*e-mail: vitaly.grigorenko@gmail.com)*

For experimental confirmation the role of residue R65 in the stabilization of TEM type  $\beta$ -lactamases with the M182T substitution, predicted by the residues interactions networks (RINs) analysis, homogeneous recombinant TEM type  $\beta$ -lactamases with R65L, M182A and a combination of R65L and M182T substitutions were obtained. The kinetic parameters of these enzymes were determined toward penicillin, ceftazidime, cephalotin, and CENTA. It was shown that all investigated substitutions did not change the substrate specificity of enzymes against  $\beta$ -lactams. The substitution of R65L led to a decrease in thermal stability, while the replacement M182A and the combination of substitutions of R65L and M182T led to an increase in the thermal stability of  $\beta$ -lactamase compared to TEM-1  $\beta$ -lactamase. Using differential scanning calorimetry, the enthalpies ( $\Delta H$ , kJ/mol) and denaturation temperatures ( $T_m$ , °C) were determined for  $\beta$ -lactamases TEM-1, TEM (M182A), TEM-135 (M182T), TEM (R65L + M182T), and the values amounted to 554.0 and 50.8; 573.7 and 51.7; 654.4 and 55.9; 647.4 and 51.9, respectively. The hypothesis of molecular mechanism, explaining the stabilizing role of M182T substitution in TEM type  $\beta$ -lactamases, was supplemented by the effect of changing the conformation of residue R65 and the establishing of its new contacts with the  $\Omega$ -loop residues.

**Key words:** recombinant TEM type  $\beta$ -lactamases, mutations, thermal stability, RINs (Residue Interaction Networks).

**Сведения об авторах:** *Григоренко Виталий Георгиевич* – ст. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, канд. хим. наук (vitaly.grigorenko@gmail.com); *Андреева Ирина Петровна* – науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, канд. хим. наук (imtek@newmail.ru); *Серова Оксана Викторовна* – науч. сотр. лаборатории клеточной биологии рецепторов Института Биоорганической Химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, канд. хим. наук (oxana.serova@gmail.com); *Рубцова Майя Юрьевна* – вед. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, канд. хим. наук (mrubtsova@gmail.com); *Егоров Алексей Михайлович* – глав. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, канд. хим. наук (alex.m.egorov@gmail.com).