

# Белковая инженерия

А. И. Корнелюк

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины  
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143, Украина

---

*В обзоре кратко проанализированы основные направления развития белковой инженерии — новой области молекулярной биологии и биотехнологии, базирующейся на достижениях генной инженерии, структурной биологии и компьютерных технологий. Белковая инженерия ставит задачу направленного изменения структуры белков для придания им новых или изменения существующих свойств либо создания белков de novo. Дизайн белка осуществляется на уровне его трехмерной структуры с использованием компьютерных методов моделирования. Рассмотрен метод сайт-направленного мутагенеза и его применение в белковой инженерии для структурно-функционального анализа белков. Представлены результаты структурно-функционального анализа тирозил-тРНК синтетаз бактерий и млекопитающих методами белковой инженерии. Описан дизайн искусственных белков de novo. Дана оценка перспективам развития белковой инженерии, ее использованию в биотехнологии и медицине.*

---

**Введение.** Белковая инженерия — новая область молекулярной биологии и биотехнологии — возникла как синтетическая наука и вобрала в себя последние достижения генной инженерии, структурной биологии и компьютерных технологий. Как главную задачу белковая инженерия ставит направленное изменение структуры существующих белков для придания им новых уникальных или изменения существующих свойств [1—3]. В белковой инженерии дизайн белка осуществляется на уровне его пространственной структуры, в чем состоит ее принципиальное отличие от генной инженерии, хотя экспериментальные методы и подходы генной инженерии являются составной частью и белковой инженерии.

Биохимики давно пытались улучшить свойства природных белков, в частности ферментов, для изменения их специфичности, каталитической активности, пределов функционирования, увеличения стабильности, придания им новых функций и т. д. Природные ферменты обычно функционируют только в узких определенных интервалах температур и физико-химических условий, что существенно ограничивает их использование в биотехнологии. Белковая инженерия позволяет адаптировать структуру белков и их свойства к условиям, необходимым для биотехнологических процессов.

Таким образом, белковая инженерия, с одной стороны, является мощным и информативным методом структурно-функционального анализа белков, а с другой, — становится одним из наиболее передовых направлений современной биотехнологии.

**Направления белковой инженерии.** Основными направлениями белковой инженерии в настоящее время являются: 1) структурно-функциональный анализ белков методами сайт-направленного мутагенеза отдельных аминокислотных остатков; 2) создание химерных и мультифункциональных белков; 3) случайный мутагенез и селекция белков с определенной функцией (молекулярная эволюция); 4) создание искусственных белков *de novo*.

При этом белковая инженерия решает следующие задачи:

1. Изменения специфичности ферментов и их каталитических характеристик (повышение  $V_{\max}$ , уменьшение  $K_m$ , изменение рН-оптимума, элиминация сайта ингибирования).

2. Изменения структурных свойств белков (повышение термостабильности, повышение стабильности в органических растворителях, изменения физикохимических свойств, модификация специфичности связывания лигандов, изменение внутримолекулярной динамики белка).

3. Создание новых систем (химерные и мультифункциональные белки, введение репортерных



Цикл отдельных этапов исследования в белковой инженерии

доменов (GFP), введение *tag*-фрагментов для очистки белков и т. д.)

4. Повышение эффективности белков как терапевтических макромолекул для применения в фармакологии и медицине.

Белковая инженерия возникла как результат логического развития генной инженерии и позволила сформулировать основные принципы модификации генов с использованием олигонуклеотидов и создать соответствующие технологии. Метод сайт-направленного мутагенеза, лежащий в основе экспериментальной белковой инженерии, разработан Смитом и соавт. в конце 70-х годов [5, 6] и дал возможность осуществлять селективные замены определенных аминокислотных остатков в белках. За создание и развитие методов сайт-адресованного мутагенеза генов в 1992 году Смит удостоен Нобелевской премии.

Последовательность отдельных этапов исследования белковой инженерии представлена на рисунке. На первом этапе осуществляется дизайн структуры белка и моделирование, на последующих — сайт-специфический мутагенез, экспрессия и очистка мутантного белка, его функциональный и структурный анализ. Успех дизайна белка с помощью компьютерных методов зависит как от понимания принципов фолдинга белков, так и от структурной информации, получаемой из баз данных.

Цикл основных этапов исследования белковой инженерии повторяется до тех пор, пока не будет достигнута поставленная задача.

Сайт-направленный мутагенез и структурно-функциональный анализ белков. Возможность направленных селективных замен определенных ами-

нокислотных остатков методом сайт-направленного мутагенеза позволяет изучать их функциональную роль. Особенно эффективным является использование этого метода в комплексе с рентгеноструктурным анализом или структурной ЯМР-спектроскопией.

При проведении данного типа мутагенеза происходит направленное изменение определенного нуклеотида в последовательности гена, приводящее к изменению соответствующей аминокислоты в белке. Используется олигонуклеотидный праймер, в последовательность которого введена планируемая мутация, с последующим его включением в состав молекулы ДНК в ходе полимеразной цепной реакции (ПЦР) или матричного синтеза ДНК. Применяя методы сайт-направленного мутагенеза, можно вводить в ДНК такие мутации, как точечные замены, вставки, делеции, инверсии, слияние генов.

Сайт-направленный мутагенез с использованием олигонуклеотидных гетеродуплексов основан на достройке мутантного олигонуклеотидного праймера, гибридного с одноцепочечной матричной ДНК, при помощи ДНК-полимеразы [5, 6]. Выход мутантов при использовании этого метода составляет около 50 %. Большинство других методов сайт-направленного мутагенеза основано на применении ПЦР, преимуществом которого является очень высокий, приближающийся к 100 %, выход мутантов [7, 8].

В последнее время процедура проведения сайт-направленного мутагенеза стала одной из рутинных методик молекулярной биологии. Ряд фирм производит стандартные наборы реактивов для сайт-направленного мутагенеза и одновременно

разрабатывает новые оригинальные методики. Одним из наиболее эффективных является метод «QuikChange» («Stratagene», США). Особенностью системы «QuikChange» является то, что праймеры должны быть взаимно комплементарными. Выход мутантов при использовании метода «QuikChange» составляет не менее 80 %. Эта система наиболее оптимальна для введения единичных нуклеотидных замен. Другая предложенная фирмой «Stratagene» система «ExSite» оптимальна для введения таких типов мутаций, как делеции и инсерции, ее эффективность составляет не менее 60 %.

К настоящему времени сайт-направленный мутагенез использован для структурно-функционального анализа многих сотен белков, результаты этих исследований обобщены во многих обзорах и монографиях [1—5]. В данном обзоре применение белковой инженерии ограничено только рассмотрением структурно-функционального анализа аминоксил-тРНК синтетаз. Одним из первых ферментов, функции которых начали изучать методами белковой инженерии еще в 1982 году, стала тирозил-тРНК синтетаза из термофильных бактерий *Bacillus stearothermophilus*.

Сайт-специфический мутагенез бактериальной тирозил-тРНК синтетазы. Ферментативное аминокислотирование тРНК аминоксил-тРНК синтетазами (АРСаза, КФ 6.1.1) на дорибосомном этапе биосинтеза белка является одним из ключевых этапов процесса реализации генетической информации. Для выяснения молекулярных механизмов специфического аминокислотирования тРНК необходимо детальное изучение структурно-функциональной организации АРСаз.

Значительный вклад в изучение структуры активного центра тирозил-тРНК синтетазы из *B. stearothermophilus* сделан с помощью сочетания методов сайт-специфического мутагенеза и рентгеноструктурного анализа [10—21]. Исследование структуры комплекса синтетазы с промежуточным продуктом Туг-АМР показало возможность существования водородной связи между SH-группой Cys35 и Thr51 в ферменте и 3'-гидроксиллом рибозного кольца Туг-АМР [10]. Замена Cys35 на Ser и Gly привели к ухудшению связывания АТР и уменьшению каталитической константы. Однако удаление водородной связи путем замены Thr51 на Ala и изменение структуры боковой цепи заменой Thr51 на Pro привели к увеличению каталитической константы и уменьшению  $K_M$  для тирозина [11, 12]. Примечательно, что при мутации Thr51—Pro соотношение  $k_{cat}/K_M$  для АТР увеличилось с 8400 до 208000  $s^{-1} M^{-1}$  для реакции формирования тирозиладенилата и с 1860 до 95800  $s^{-1} M^{-1}$  для

реакции переноса аминокислотного остатка на тРНК [12]. На основании полученных данных установлено, что механизм катализа реакции активации тирозина включает образование пентакоординатного промежуточного соединения, фосфатная группа которого может взаимодействовать с боковыми цепями Thr40 и His45 [13].

Изучение кинетических свойств мутантных ферментов дало прямые доказательства того, что главным фактором каталитического механизма является стабилизация переходного состояния [13—16]. Основными группами, роль которых в катализе состоит в стабилизации переходного комплекса, являются His45 и Thr40, кроме того, важную функциональную роль играют остатки Tyr34, Cys35, His48, Thr51 и Tyr169. Полученные данные позволили сделать вывод о том, что тирозил-тРНКсинтетаза из *B. stearothermophilus* при катализе использует механизм стабилизации переходного комплекса (в противоположность предполагаемому механизму нуклеофильному или кислотно-основному катализу), причем стабилизация происходит как за счет водородных связей, так и электростатических взаимодействий [13].

С помощью сайт-специфического мутагенеза получена уникальная информация о функционировании тирозил-тРНК синтетазы, оказавшейся недоступной для рентгеноструктурного анализа. В работе [13] реконструирована модель переходного состояния при активации тирозина, благодаря чему обнаружены взаимодействия с подвижными петлями синтетазы, содержащими положительно заряженные остатки Lys82, Arg86, Lys230 и Lys233. Эти петли взаимодействуют с комплексом, находящемся в переходном состоянии, по механизму индуцированного соответствия. Однако, по данным рентгеноструктурного анализа для комплекса тирозил-тРНК синтетазы из *B. stearothermophilus* с тирозиладенилатом, эти остатки удалены на расстояние более 0,8 нм. На основании этого сделан вывод о том, что в растворе бактериальная тирозил-тРНК синтетаза при функционировании может претерпевать значительные конформационные движения петель, которые не обнаруживаются в кристалле при исследовании методом рентгеноструктурного анализа.

Методами сайт-направленного мутагенеза исследованы и межсубъединичные взаимодействия в димере тирозил-тРНК синтетазы [21]. Направленная замена гидрофобного Phe164, находящегося в области контакта субъединиц, на заряженные остатки Asp и Lys приводила к обратимой диссоциации активного димера на неактивные мономеры [21].

Интересные данные получены по антикооперативному взаимодействию субъединиц в тирозил-тРНК синтетазе из *B. stearothermophilus* [22]. Димер тирозил-тРНК синтетазы, являющийся, по данным рентгеноструктурного анализа, симметричным, в растворе асимметричен [22].

Исследования с помощью сайт-специфического мутагенеза внесли также значительный вклад в изучение структуры тРНК-связывающего центра тирозил-тРНК-синтетазы из *B. stearothermophilus*. Установлено, что кластер положительно заряженных аминокислотных остатков Arg207-Lys208 в N-концевом домене одной субъединицы взаимодействует с акцепторным стеблем тРНК [23]. Два отдельных кластера положительно заряженных аминокислотных остатков (Arg368-Arg371 и Arg407-Arg408-Lys410-Lys411) в С-концевой области взаимодействуют с антикодонной ветвью тРНК<sup>Tyr</sup>, при этом происходит фиксирование тРНК на молекуле фермента в определенной ориентации. В работе [24] предложена детальная модель взаимодействия тРНК<sup>Tyr</sup> и тирозил-тРНК синтетазы из *B. stearothermophilus* на основании данных рентгеноструктурного анализа, сайт-специфического мутагенеза и компьютерного моделирования. Согласно модели, контакт между остатком Trp-196 и кьюозином в 1-м положении антикодона тРНК<sup>Tyr</sup> является неспецифическим, а аденин-76 тРНК<sup>Tyr</sup> взаимодействует с Lys-82 и Arg-86. Особый интерес вызывает обнаруженный в [24] дополнительный контакт между тРНК<sup>Tyr</sup> и тирозил-тРНК синтетазой, который возникает при переходе фермент-субстратного комплекса из стадии инициации в переходную стадию. Этот контакт осуществляется между остатком Lys-151 тирозил-тРНК синтетазы и аденином-73 в тРНК<sup>Tyr</sup> и является критическим для узнавания тирозил-тРНК синтетазой тРНК<sup>Tyr</sup> среди других тРНК.

Сайт-специфический мутагенез тирозил-тРНК синтетазы млекопитающих. Цитоплазматическая тирозил-тРНК синтаза млекопитающих является гомодимером с молекулярной массой  $2 \times 59$  кДа [23]. Каждый мономер состоит из двух основных структурных модулей: NH<sub>2</sub>-концевого каталитического модуля («минимальная» тирозил-тРНК синтаза), который включает нуклеотидсвязывающую свертку Россмана с соединительным пептидом, формирующим межсубъединичный интерфейс, и некаталитического цитокинподобного COOH-концевого модуля [24]. Проблема выяснения строения активного центра и механизма узнавания эукариотической тРНК<sup>Tyr</sup> тирозил-тРНК синтетазой является весьма важной, поскольку эукариотическая тРНК<sup>Tyr</sup> содержит короткую до-

полнительную петлю, в отличие от длиннопетлевых тРНК<sup>Tyr</sup> прокариотов, и не аминоацелируется бактериальным ферментом [24]. Ранее с помощью методов селективных химических модификаций нами изучена структура активного центра эукариотической тирозил-тРНК синтетазы [24, 25]. Сделан вывод о существенной роли остатков лизина, причем критическим для активности фермента является только один остаток лизина.

Методами сайт-направленного мутагенеза нами изучена функциональная роль остатков лизина, локализованных в соединительном пептиде тирозил-тРНК синтетазы [26]. Аминокислотные замены вводили с использованием ПЦР и мутантного праймера Gln142-Val153. Получены два варианта мутаций в тирозил-тРНК синтетазе: Lys147Tyr и двойная Lys146Asp, Lys147Tyr. Замена как двух остатков лизина, так и одного Lys147 приводила к практически полной потере ферментативной активности синтетазы в реакции аминоацелирования эукариотической тирозин-специфичной тРНК [26].

Таким образом, методами белковой инженерии впервые показано, что критическим остатком лизина в реакции аминоацелирования тРНК эукариотической тирозил-тРНК синтетазой является остаток Lys147, локализованный в соединительном пептиде нуклеотидсвязывающего домена синтетазы, соединяющем две половины свертки Россмана, — нуклеотидсвязывающего домена. Данный остаток лизина 147 является одним из наиболее интересных структурных элементов тРНК-связывающего центра бычьей тирозил-тРНК синтетазы, так как, очевидно, он соответствует одному функционально важному остатку лизина, обнаруженному нами ранее [25] в экспериментах по модификации синтетазы селективным реагентом пиридоксаль-5'-фосфатом. При модификации этого единственного остатка лизина, с одной стороны, почти полностью ингибировалась активность фермента, а с другой, — проявлялась антикооперативность взаимодействия двух субъединиц синтетазы [25]. Данный остаток, вероятно, соответствует остатку лизина в тирозил-тРНК синтетазе из *B. stearothermophilus*, участвующему в формировании дополнительного контакта с тРНК<sup>Tyr</sup> (аденином-73) в переходном состоянии и является критическим для узнавания тРНК<sup>Tyr</sup> среди других тРНК *B. stearothermophilus* [16, 17].

Тирозил-тРНК синтетазы высших эукариот содержат дополнительный COOH-концевой модуль (С-модуль), гомологичный цитокину ЕМАР II и также проявляющий цитокиновую активность в экспериментах *in vitro* [27]. Как и некоторые гомологичные домены, С-модуль имеет сродство к нуклеиновым кислотам. Для дальнейшего струк-

турно-функционального анализа С-модуля методами моделирования по гомологии построена модель его пространственной структуры [28]. Анализ модели показал наличие в структуре С-модуля потенциальных сайтов взаимодействия с тРНК<sup>Tyr</sup>, а также участка, ответственного за цитокиновую активность. Полученная модель трехмерной структуры С-модуля может служить основой для дальнейшего исследования особенностей структуры и функций тирозил-тРНК синтетазы методами белковой инженерии. Так, например, нами обнаружен эффект олигомеризации С-домена в растворе и образование фибриллоподобных агрегатов. Для предотвращения олигомеризации белка методом сайт-направленного мутагенеза получен тройной мутант Glu479Lys, Asn509Pro и Met511Glu С-домена тирозил-тРНК синтетазы. Экспрессия, выделение и изучение свойств полученного тройного мутанта С-модуля показали, что он не проявляет тенденции к агрегации, характерной для нативного домена.

Компьютерное моделирование белков. Компьютерное моделирование белков является одним из ключевых этапов применения методов белковой инженерии. Значительные успехи в секвенировании геномов организмов, включая расшифровку генома человека, стимулировали развитие компьютерной структурной биологии (биологии *in silico*) [29, 30]. На основе анализа экспериментально определенных структур белков разработаны эмпирические правила и алгоритмы предсказания их трехмерной структуры, являющиеся основой молекулярного моделирования пространственной структуры белков. В настоящее время банк данных PDB содержит более 15000 пространственных структур различных белков. Атомные координаты гомологичного белка могут быть использованы как пространственная матрица для моделирования по гомологии. С помощью «компьютерного мутагенеза» боковые радикалы аминокислотных остатков заменяются на остатки моделируемого белка, структура которого затем оптимизируется. Для оценки фазового пространства структурной модели используют неэмпирические, полуэмпирические и эмпирические методы. К наиболее часто используемым эмпирическим методам относится метод силового поля — физической модели описания макромолекулы аналитическими функциями для энергии взаимодействия между всеми парами атомов. Для анализа модели пространственной структуры белка и последующего дизайна новой структуры белка используются методы компьютерной графики.

Увеличение стабильности белков. Использование ферментов в инженерной энзимологии обычно включает проведение биотехнологических процес-

сов при повышенных температурах. Критическим параметром для использования ферментов в биотехнологических процессах является их термостабильность. В настоящее время стандартным подходом для увеличения термостабильности белков является конструирование термостабильных мутантов путем введения S-S связей на основе известной 3D-структуры. Такой подход реализован, в частности, для ксиланазы из *Bacillus circulans* [31] за счет введения новых S-S связей методом сайт-направленного мутагенеза. Комбинация мутаций привела к получению мутантного белка ксиланазы, термостабильность которого увеличилась на 15 °С. В результате введения мутаций выяснилось, что сохранность активного центра зависит от стабильности первого тяжа  $\beta$ -листа, так как он является мобильным в белковой структуре [31].

Другой подход для увеличения термостабильности был реализован для  $\alpha$ -амилазы из *Bac. licheniformis*, используемой при промышленном гидролизе крахмала. С помощью случайного мутагенеза и скрининга белков на термостабильность обнаружен мутант Val209Ala, имеющий время жизни белка, увеличенное в 3 раза [32]. Этот подход широко используется даже в случае отсутствия детальной пространственной структуры изучаемого белка.

Методами белковой инженерии получен мутантный цитокин IL-6 с заменой Ser176 на Arg и повышенной биологической активностью по сравнению с природным IL-6 (Патент США WO 94/11402). Методами сайт-направленного мутагенеза получены глюкозоизомеразы с повышенным сродством к D-глюкозе с заменами Trp139Phe, Tyr; Val186Thr (Патент США 5266475).

Сериновые протеазы семейства химотрипсिनот были модифицированы таким образом, что приобрели устойчивость к ингибиторам сериновых протеаз, что может применяться для терапии заболеваний, связанных со свертыванием крови (Патент США WO 94/03614).

Дизайн белков *de novo*. При дизайне белков *de novo* конструируются новые полипептидные последовательности, которые могут свертываться в определенные пространственные структуры с компактной укладкой и являться носителями заданных функций белка [34]. Основные правила дизайна *de novo* сейчас хорошо известны для простых структур, таких как четырехспиральная связка [1].

ДеГрадо и соавт. [35, 37] провели дизайн и получили белок  $\alpha_4$ , состоящий из четырех одинаковых  $\alpha$ -спиралей, соединенных тремя петлями, и содержащий гидрофобное ядро из лейциновых остатков [37]. Экспериментальными методами пока-

зано, что белок  $\alpha_4$  компактен, стабилен при денатурации, обладает высоким содержанием  $\alpha$ -спиральной структуры, но в то же время находится в состоянии «расплавленной глобулы». Состояние «расплавленной глобулы» является интермедиатом при самоорганизации белка [38, 39]. Макромолекула белка при этом обладает значительной внутримолекулярной динамикой и более лабильна, чем нативная структура белка, поскольку в ней утрачена плотная специфическая укладка внутренних групп [38, 39].

Тетраспиральный домен «феликс» с неповторяющейся последовательностью [36, 41] обладал компактной структурой, однако тоже находился в состоянии «расплавленной глобулы». Дизайном *de novo* получено несколько металлосвязывающих белков: тетраспиральный белок «гелихром» [42], связывающий железо, и гемопротеид, связывающий рутений [43].

Одним из распространенных классов структуры белков является  $\beta\alpha$ -баррель. В работе [18] получен искусственный белок октареллин, состоящий из повторенной восемь раз 31-членной аминокислотной последовательности. Оказалось, что данный белок имел упорядоченную вторичную структуру и способность к кооперативному денатурационному переходу. Низкая кооперативность перехода позволила предположить, что октареллин находится в состоянии «расплавленной глобулы».

$\beta$ -Структурный белок бетабеллин сконструирован авторами [19] по типу «сэндвича» из двух идентичных четырехнитчатых антипараллельных  $\beta$ -листов. Один из вариантов бетабеллина исследовали методом двухмерной ЯМР-спектроскопии [63], вследствие чего также выявлено состояние «расплавленной глобулы» для структуры белка. Исследователям удалось сконструировать белки и с новой, не обнаруженной до сих пор в природе, структурной организацией. Первая из таких белковых структур, альбегетин, состояла из двух повторяющихся элементов  $\alpha\beta$  и представляла собой 4-тяжевый антипараллельный  $\beta$ -лист [46]. Далее альбегетин модифицировали для введения в его состав биологически активного участка фрагмента интерферона [45]. Анализ структуры нового белка альбегетина (альбегетин с фрагментом интерферона) показал, что он компактен, стабилен и обладает близкой к альбегетину вторичной структурой, то есть введение биологически активного фрагмента не нарушило существенным образом общей структуры искусственного белка. Обнаружено, что альбегетин имеет высокое сродство к рецепторам тимоцитов мыши и активирует реакцию бласт-трансформации тимоцитов даже эффективнее, чем

интерферон [45]. В перспективе подобные белковые конструкции могут быть использованы в качестве носителей самых различных биологических активностей.

В то же время большинство белков, созданных *de novo*, находится в состоянии, более близком к состоянию «расплавленной глобулы», нежели к нативному состоянию. Дальнейшее развитие этой области может быть достигнуто только на основе более детального дизайна с тщательным компьютерным моделированием и минимизацией получаемых пространственных структур белков. Так, например, в последнее время разработан полностью автоматизированный алгоритм дизайна белков *de novo* [41]. Данный алгоритм основан на расчете потенциальной энергии и стереохимических ограничений и используется для скрининга  $1,9 \cdot 10^{27}$  возможных аминокислотных последовательностей для совместимости с белком-мишенью — мотивом  $\beta\beta\alpha$ , представляющим «zinc finger» ДНК-связывающий домен [41]. Полученный FSD-1 белок имел очень низкую гомологию аминокислотной последовательности с любым другим известным белком. Пространственная структура FSD-1 белка в растворе, по данным ЯМР-спектроскопии, представляет собой компактную хорошо упорядоченную глобулу [41].

**Белковая инженерия и биотехнология.** Белковая инженерия позволяет конструировать и создавать новые белки с уникальными или усиленными свойствами (биологическая активность, термостабильность и т. д.). Быстрый прогресс ее применения в биотехнологии обеспечил получение многих важных продуктов для рынка и имеет большие перспективы. Мировая фармацевтическая промышленность в настоящее время интенсивно использует белковую инженерию для получения новых лекарственных средств. Мощный экономический потенциал белковой инженерии стимулирует главные фармацевтические и химические кампании расходовать огромные средства на развитие исследовательских программ по белковой инженерии. В Японии образован консорциум из 14 компаний для развития Института по исследованиям белковой инженерии (PERI) с бюджетом более 100 млн долларов для создания новых и усовершенствования известных белков. Общие стратегии сосредоточены на наиболее важных терапевтических белках и полипептидных гормонах, при этом используются новые технологии скрининга лекарственных препаратов.

**Перспективы.** Современный уровень развития белковой инженерии открывает широкие перспективы как для фундаментальной молекулярной био-

логии, так и для ее практического применения. Белковая инженерия использует комплекс современных подходов для структурно-функционального анализа белков, что позволяет вводить направленные мутации в любые сайты белка, изучать структуру и тонкие механизмы функционирования ферментов.

На основе использования структурного анализа белков и компьютерного моделирования могут быть созданы новые мутантные белки для медицинских целей, например, цитокины с усиленной биологической активностью, модифицированные антитела и т. д. [47, 50]. На основе экспрессии *in vivo* мутантных белков с измененными свойствами (усиленное или ослабленное действие, элиминация сайтов фосфорилирования, протеолиза и др.) возможно создание нового подхода в генной терапии.

Повышение стабильности белков методами направленного изменения их структуры расширяет возможности их применения в различных областях биотехнологии. Новым направлением использования белковой инженерии может быть ее союз с микроэлектроникой и создание новых биосенсоров [48]. В свою очередь, это открывает возможности появления исключительно малых быстродействующих биочипов [49] для компьютеров нового поколения.

A. I. Kornelyuk

Protein engineering

Summary

*The main directions of protein engineering — a novel branch of molecular biology and biotechnology, — are briefly analysed in this review. Protein engineering is based on the achievements of genetic engineering, structural biology and computer technologies. The main goal of protein engineering is a directed alteration of 3D protein structure with the aim of acquisition of novel properties or change of existing properties; or protein design de novo. Protein design is carried out on the level of 3D protein structure using the computer modelling methods. The site-directed mutagenesis method and its applications in protein engineering for structural and functional analysis of proteins is considered. The results of structural and functional investigations of bacterial and mammalian tyrosyl-tRNA synthetases by protein engineering are presented. Protein design of artificial proteins de novo is described. The perspectives of development of protein engineering and its application in biotechnology and medicine are given in the review.*

O. I. Корнелюк

Білкова інженерія

Резюме

*В огляді стисло проаналізовано основні напрямки розвитку білкової інженерії — нової галузі молекулярної біології і біотехнології, яка базується на досягненнях генної інженерії, структурної біології та комп'ютерних технологій. Білкова інженерія ставить своїм завданням направлену зміну струк-*

*тури білків для надання їм нових чи зміни існуючих властивостей або створення білків de novo. Дизайн білка здійснюється на рівні його тривимірної структури з використанням комп'ютерних методів моделювання. Розглянуто метод сайт-спрямованого мутагенезу і його використання в білковій інженерії для структурно-функціонального аналізу білків. Представлено результати структурно-функціонального аналізу тирозил-тРНК синтетаз бактерій і ссавців методами білкової інженерії. Описано дизайн штучних білків de novo. Зроблено оцінку перспективам розвитку білкової інженерії, її використанню в біотехнології і медицині.*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Protein Engineering and Design* / Ed. P. R. Carey—New York: Acad. press, 1996.
2. *Concepts in Protein Engineering and Design* / Eds P. Wrede, G. Schneider.—New York: Acad. press, 1994.
3. *Leatherbarrow R. J., Fersht A. R. Protein engineering* // *Protein Eng.*—1986.—1.—P. 7—16.
4. *Shao Z., Arnold F. Engineering new functions and altering existing functions* // *Curr. Opin. Struct. Biol.*—1996.—6.—P. 513—518.
5. *Gillam S., Smith M. Site-specific mutagenesis using synthetic oligonucleotide primers: I. Optimum conditions and minimum oligodeoxyribonucleotide length. II. In vitro selection of mutant DNA* // *Gene.*—1979.—8, N 1.—P. 81—106.
6. *Zoller M., Smith M. Oligonucleotide-directed mutagenesis using M13-derived vectors: an efficient and general procedure for the production of point mutations in any fragment of DNA* // *Nucl. Acids Res.*—1982.—10.—P. 6487—6500.
7. *Boles E., Miosga T. A rapid and highly efficient method for PCR-based site-directed mutagenesis using only one new primer* // *Curr. Genet.*—1995.—28.—P. 197—198.
8. *Barik S. Mutagenesis and gene fusion by megaprimer PCR* // *Methods in Molecular Biology, PCR Cloning Protocols* / Ed. B. A. White.—New York: Humana press, 1997.—Vol. 67.—P. 173—182.
9. *Moore J. C., Arnold F. H. Directed evolution of a para-nitrobenzyl esterase for aqueous-organic solvents* // *Nature Biotechnol.*—1996.—14.—P. 458—467.
10. *Fersht A. R., Leatherbarrow R. J., Wells T. N. Quantitative analysis of structure-activity relationships in proteins by linear free-energy relationships* // *Nature.*—1986.—322, N 6077.—P. 284—286.
11. *Wilkinson A. J., Fersht A. R., Blow D. M., Winter G. Site-directed mutagenesis as a probe of enzyme structure and catalysis: tyrosyl-tRNA synthetase cysteine-35 to glycine-35 mutation* // *Biochemistry.*—1983.—22, N 15.—P. 3581—3586.
12. *Fersht A. R., Shi J. P., Wilkinson A. J., Blow D. M., Carter P., Waye M. M. Y., Winter G. Analyse von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen by Enzymen durch Protein Engineering* // *Angew. Chem.*—1984.—96, N 7.—P. 455—462.
13. *Fersht A. R., Knill-Jones J., Bedouelle H., Winter G. Reconstruction by site-directed mutagenesis of the transition state for the activation of tyrosine by the tyrosyl-tRNA synthetase: a mobile loop envelopes the transition state in an induced-fit mechanism* // *Biochemistry.*—1988.—27.—P. 1581—1587.
14. *Ferst E. A., Fersht A. R. Mutational and kinetic analysis of a mobile loop in tyrosyl-tRNA synthetase* // *Biochemistry.*—1993.—32, N 49.—P. 13658—13663.
15. *Ferst E. A., Fersht A. R. Mutation of lysine 233 to alanine introduces positive cooperativity into tyrosyl-tRNA synthetase* // *Biochemistry.*—1993.—32, N 49.—P. 13651—13657.
16. *Wells T. N. C., Ho C. K., Fersht A. R. Free energy of hydrolysis of tyrosyl-adenylate and its binding to wild type and*

- engineered mutants of tyrosyl-tRNA synthetase // *Biochemistry*.—1986.—25, N 21.—P. 6603—6608.
17. Wilkinson A. J., Fersht A. R., Blow D. M., Carter P., Winter G. A large increase in enzyme-substrate affinity by protein engineering // *Nature*.—1984.—307.—P. 187—188.
  18. Laetherbarrow R. J., Fersht A. R., Winter G. Transition-state stabilization in the mechanism of tyrosyl-tRNA synthetase revealed by protein engineering // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1985.—82, N 23.—P. 7840—7844.
  19. Ward W. H. J., Fersht A. R. Asymmetry of tyrosyl-tRNA synthetase in solution // *Biochemistry*.—1988.—27.—P. 1041—1049.
  20. Jones D. H., McMillan A. J., Fersht A. R. Reversible dissociation of dimeric tyrosyl-tRNA synthetase by mutagenesis at the subunit interface // *Biochemistry*.—1985.—24, N 21.—P. 5852—5857.
  21. Bedouelle H., Winter G. A model of synthetase-transfer RNA interaction as deduced by protein engineering // *Nature*.—1986.—320, N 6060.—P. 371—373.
  22. Labouze E., Bedouelle H. Structural and kinetic bases for the recognition of tRNA<sup>Tyr</sup> by tyrosyl-tRNA synthetase // *J. Mol. Biol.*—1989.—205.—P. 729—735.
  23. Корнелюк А. И., Курочкин И. В., Мацука Г. Х. Тирозил-тРНК синтетаза из печени быка. Выделение и физико-химические свойства // *Молекуляр. биология*.—1988.—22, № 1.—С. 176—186.
  24. Корнелюк А. И. Структурно-функциональное исследование тирозил-тРНК синтетазы // *Биополимеры и клетка*.—1998.—14, № 4.—С. 349—359.
  25. Найденов В. Г., Вудмаска М. И., Мацука Г. Х., Корнелюк А. И. Сайт-направленный мутагенез остатков лизина, локализованных в соединительном пептиде нуклеотидсвязывающего домена (свертки Россмана) тирозил-тРНК синтетазы из печени быка // *Биополимеры и клетка*.—2000.—16, № 4.—С. 275—280.
  26. Гнатенко Д. В., Корнелюк А. И., Лаврик О. И. Химическая модификация остатков лизина тирозил-тРНК синтетазы из печени быка с помощью пиридоксаль-5'-фосфата // *Биохимия*.—1991.—56, № 11.—С. 56—60.
  27. Kornelyuk A. I., Tas M. P. R., Dybrovsky A., Murray C. Cytokine activity of the non-catalytic EMAP-2-like domain of mammalian tyrosyl-tRNA synthetase // *Биополимеры и клетка*.—1999.—15, N 2.—P. 168—172.
  28. Голуб А. Г., Одынец К. А., Ныпорко А. Ю., Корнелюк А. И. Моделирование пространственной структуры COOH-концевого цитокин-подобного модуля цитоплазматической тирозил-тРНК синтетазы млекопитающих // *Биополимеры и клетка*.—2000.—16, № 6.—С. 515—524.
  29. Schwede T., Diemand A., Guex N., Peitsch M. C. Protein structure computing in the genomic era // *Res. Microbiol.*—2000.—151, N 2.—P. 107—112.
  30. Peitsch M., Schwede T., Guex N. Automated protein modelling the proteome in 3D // *Pharmacogenomics*.—2000.—1, N 3.—P. 257—266.
  31. Wakarchuk W. Thermostabilization of the *Bac. circulans* xylanase by the introduction of disulfide bonds // *Protein Eng.*—1994.—7, N 11.—P. 1379—1386.
  32. Declerck N., Joyet P., Trosset J. Y., Carnier J., Gaillardin C. Hyperthermostable mutants of *Bacillus licheniformis*  $\alpha$ -amylase: multiple amino acid replacements and molecular modelling // *Protein Eng.*—1995.—8.—P. 1029—1037.
  33. Bruins M. E., Janssen A. E., Boom R. M. Thermozyymes and their applications: a review of recent literature and patents // *Appl. Biochem. and Biotechnol.*—2001.—90, N 2.—P. 155—186.
  34. Долгих Д. А., Курничников М. П., Птицын О. Б., Чемерис В. В. Белковая инженерия искусственных белков // *Молекуляр. биология*.—1996.—30.—С. 261—272.
  35. Regan L., DeGrado W. F. Characterization of a helical protein designed from first principles // *Science*.—1988.—241.—P. 976—978.
  36. Hecht M. H., Richardson J. S., Richardson D. C., Ogden R. C. De novo design, expression, and characterization of felix: a four-helix bundle protein of native-like sequence // *Science*.—1990.—249.—P. 884—891.
  37. DeGrado W. F., Wasserman Z. R., Lear J. D. Protein design, a minimalist approach // *Science*.—1989.—243.—P. 622—627.
  38. Dolgikh D. A., Gilmanchin R. I., Brazhnikov E. V., Bychkova V. E., Semisotnov G. V., Veniaminov S. Yu., Ptitsyn O. B.  $\alpha$ -Lactalbumin: compact state with fluctuating tertiary structure // *FEBS Lett.*—1981.—136.—P. 311—315.
  39. Dolgikh D. A., Kolomiets A. P., Bolotina I. A., Ptitsyn O. B. Molten-globule state accumulates in carbonic anhydrase folding // *FEBS Lett.*—1984.—165.—P. 88—92.
  40. Ptitsyn O. B. Motile globule state // *Protein Folding / Ed. T. E. Creighton*.—New York: Freeman, 1992.—243—300.
  41. Dahiya V., Mayo S. De novo protein design: fully automated sequence selection // *Science*.—1997.—278.—P. 82—87.
  42. Sasaki T., Kaiser T. E. Helichrome: Synthesis and enzymatic activity of a designed heme protein // *J. Amer. Chem. Soc.*—1989.—111.—P. 180—181.
  43. Ghadiri M. R., Soares C., Choi Ch. Design of an artificial 4-helix bundle metalloprotein via a novel ruthenium (II) assisted self-assembly process // *J. Amer. Chem. Soc.*—1992.—114.—P. 4000—4002.
  44. Ackerfeldt K. S., Lear J. P., Wasserman Z. R., Chung L. A., DeGrado W. F. Synthetic peptides as models for ion channel proteins // *Acc. Chem. Res.*—1993.—26.—P. 191—197.
  45. Долгих Д. А., Габриэлян А. Э., Новолюцкая Е. В., Чемерис В. В., Курничников М. П. Искусственный белок с заданной пространственной структурой и биологической активностью // *Биофизика*.—1993.—28.—С. 67—74.
  46. Bornscheuer U. T., Pohl M. Improved biocatalysts by directed evolution and rational protein design // *Curr. Opin. Chem. Biol.*—2001.—5, N 2.—P. 137—143.
  47. McCafferty J., Glover D. R. Engineering therapeutic proteins // *Curr. Opin. Struct. Biol.*—2000.—10, N 4.—P. 417—420.
  48. Hunt J. A., Lesburg C. A., Christianson D. W., Thompson R. B., Fierke C. A. Active-site engineering of carbonic anhydrase and its application to biosensors // *EXS*.—2000.—90.—P. 221—40.
  49. Weinberger S. R., Morris T. S., Pawlak M. Recent trends in protein biochip technology // *Pharmacogenomics*.—2000.—1, N 4.—P. 395—416.
  50. Isaacs J. D. From bench to bedside: discovering rules for antibody design, and improving serotherapy with monoclonal antibodies // *Rheumatology (Oxford)*.—2001.—40, N 7.—P. 724—738.