

УДК 577.113.6, 577.151.4

ИЗУЧЕНИЕ КАТАЛИТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ РЕКОМБИНАНТНЫХ β -ЛАКТАМАЗ ТЕМ-1 И ТЕМ-171 МОЛЕКУЛЯРНОГО КЛАССА А

В.Г. Григоренко, И.П. Андреева, М.Ю. Рубцова, В.В. Бурмакин, И.В. Упоров,
А.М. Егоров

(кафедра химической энзимологии химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова; e-mail: vitaly.grigorenko@gmail.com)

Созданы штаммы-продуценты и получены гомогенные препараты рекомбинантных ферментов β -лактамаз класса А ТЕМ-1 и ТЕМ-171, отличающихся аминокислотной заменой валина в положении 84 на изолейцин (Val84Ile). Определены кинетические параметры β -лактамазы ТЕМ-171 с использованием хромогенного субстрата CENTA ($K_{m, каж} = 23$ мкМ, $k_{кат} = 102$ с⁻¹). Установлен конкурентный тип ингибирования рекомбинантных β -лактамаз ТЕМ-1 и ТЕМ-171 тазобактамом; значения констант ингибирования в реакции гидролиза субстрата CENTA составили 0,057 и 0,047 мкМ для ТЕМ-1 и ТЕМ-171 соответственно. Показано, что мутация (Val84Ile) приводит к уменьшению стабильности фермента ТЕМ-171 в 1,5 раза.

Ключевые слова: рекомбинантная β -лактамаза ТЕМ-1, ТЕМ-171, CENTA, кинетические параметры, тазобактам, конкурентный тип ингибирования.

Устойчивость возбудителей инфекционных заболеваний к антибиотикам является серьезной проблемой во всем мире. В последние годы эта проблема стала еще более угрожающей в связи с распространением панрезистентных микроорганизмов [1]. Самые распространенные в настоящее время виды резистентности связаны с продукцией бактериями ферментов β -лактамаз, способных гидролизовать β -лактамное кольцо антибиотиков. Эти ферменты образуют огромное семейство, насчитывающее уже более 1300 представителей [2]. Они эволюционируют с высокой скоростью, характеризуются высокой мутабельностью и структурной изменчивостью. В настоящее время особое внимание уделяется исследованиям структуры как активного центра, так и возможных участков аллостерического регулирования β -лактамаз в целях поиска соединений – модуляторов ферментативной активности [3]. Известно, что эволюция β -лактамаз развивается по двум основным механизмам – возникновение новых мутаций у известных ферментов и появление ферментов с новой структурой. Описано несколько мутаций β -лактамаз, получивших название «ключевые», которые способствуют расширению спектра субстратной специфичности, изменению каталитической активности и возникновению устойчивости к ингибиторам [4]. Это подчеркивает необходимость всестороннего изучения структурных особенностей и механизма

действия β -лактамаз. Комплексное исследование различных мутантных форм β -лактамаз и установление взаимного влияния мутаций на структурные особенности и каталитические параметры ферментов позволят перейти к созданию нового типа ингибиторов, а также найти новые способы преодоления резистентности микроорганизмов к антибиотикам.

β -Лактамаза ТЕМ-1 относится к молекулярному классу А и является первым ферментом, выделенным в начале 1960-х годов из крови инфицированного пациента [5]. β -Лактамазы ТЕМ-типа имеют компактную структуру, образованную одной полипептидной цепью с молекулярной массой около 30 кДа, не содержат сахара и металлов в активном центре. β -Лактамаза ТЕМ-1 является модельным ферментом для изучения влияния различных мутаций на ферментативную активность. В настоящее время в Protein Data Bank представлены 47 структур β -лактамазы ТЕМ-1 и ее мутантов в комплексе с молекулами лекарственных средств и ингибиторов в разном разрешении [6–8]. Рентгенокристаллографические исследования комплексов ферментов с эффекторами, в том числе с ингибиторами, являются основой для исследования механизмов их взаимодействия. Анализ кристаллических структур β -лактамазы ТЕМ-1 и ее мутантов показывает, что точечные мутации приводят к небольшим структурным изменениям, таким как

перемещение разделенных аминокислот и молекул воды вокруг мутировавших остатков, которые влияют на каталитическую активность фермента [9, 10]. Наличие некоторых мутаций делает фермент способным расщеплять как пенициллины, так и цефалоспорины. Установлено, что некоторые мутации существенно изменяют конфигурацию петель активного центра [11]. Также показано, что эти сильно дестабилизирующие молекулу мутации возникают в комбинации с другими, компенсационными [7]. Существует гипотеза, что такие «вторичные» мутации способны компенсировать дефекты в каталитической активности или стабильности, вызванные первичными мутациями [12]. Подобный анализ расположения мутаций и их взаимного влияния на каталитическую активность β -лактамаз разных типов может обеспечить получение новых данных о взаимосвязях структура–активность данного семейства ферментов.

Цель настоящего исследования – получение рекомбинантных β -лактамаз TEM-1 и TEM-171, отличающихся заменой в положении 84 (Val84Ile), сравнительное изучение их каталитических свойств, определение типа и значения констант ингибирования (K_i) тазобактамом, изучение термостабильности.

Экспериментальная часть

В работе использовали реагенты компаний «Sigma», «Fluka» и «Difco». Белковый электрофорез (ДСН-ПААГ) осуществлен по стандартной методике с применением набора белков (SM0431, MBI-Fermentas) в качестве стандартов молекулярной массы. Для работы с ДНК использованы киты QIA Spin Miniprep Kit и QIAquick Gel extraction Kit («Qiagen», Германия). Ферменты рестрикции и модификации ДНК произведены компаниями «New England Biolabs» и «MBI-Fermentas». Олигонуклеотиды для секвенирования и ПЦР заказывали в компании «Синтол» (Россия); секвенирование ДНК проводили в компании «Евроген» (Россия). Для определения концентрации белка использовали BCA тест-набор («Sigma», США); носители для хроматографической очистки SOURCE™ 15Q («GE Healthcare», Швеция). Все водные растворы готовили на деионизованной воде MilliQ («Millipore», Франция).

Микроорганизмы, среды, плазмиды и олигонуклеотиды. Для генетических манипуляций использованы клетки *E. coli* линии DH5 α , плазмидный вектор pET-24, для экспрессии белка – *E. coli* BL21(DE3) («Novagen», США). Клетки культивировались в среде LB (1%-й экстракт дрожжей,

1%-й пептон, 0,5%-й NaCl), содержащей 50 мг/л канамицина.

Для получения компетентных клеток *E. coli* культура наращивалась до OD₆₀₀ 0,4–0,6 в 50 мл среды LB и отделялась от культуральной среды центрифугированием при скорости 3500 \times g при 4°C в течение 10 мин. Полученный осадок клеток был ресуспендирован 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 MgCl₂; pH 6,5), выдержан в течение 1 ч на льду, расфасован на аликвоты по 200 мкл и быстро заморожен при –80°C.

Поиск нуклеотидных последовательностей генов β -лактамаз осуществлялся на сайтах клиники Lahey (www.lahey.org/studies/) и Европейского института биоинформатики (www.ebi.ac.uk/). Выравнивание последовательностей β -лактамаз проводили с помощью программы Multiple alignment, Multaline DNA (<http://npsa-pbil.ibcp.fr/>). Транслирование нуклеотидной последовательности ДНК в аминокислотную осуществлялось на сервере ExPASy Proteomics Server, Translate tool (<http://expasy.org/tools/dna.html/>). Расчет pI и Mw белка выполнялся также на данном сервере (http://au.expasy.org/tools/pi_tool.html).

Праймеры для клонирования гена TEM-1 β -лактамазы в плазмидный вектор pET-24a(+) по сайтам NdeI/NotI: прямой 5'-TTATATTAACATATGCACCCAGAAACGCTGGTGAAG-3' и обратный 5'-TTTGCGGCCGCTCACCAATGCTTAATCAGTGAGGC-3'. Для амплификации ДНК использовали метод ПЦР с Pfu-полимеразой. В качестве матрицы использовали pET-15. Очистку полученных ПЦР-продуктов проводили на колонках QIAquick («PCR Purification Kit», «Qiagen», Германия) согласно протоколу производителя.

Введение мутаций методом Quick Change.

Амплификацию проводили в общем объеме 25 мкл в тонкостенных пробирках (0,2 мл) в ДНК-амплификаторе по следующему протоколу: начальная денатурация при 95°C, 2 мин; амплификация, 15 циклов: 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°C. В полученную после ПЦР смесь добавляли рестриктазу DpnI и после инкубации при 37°C в течение 1 ч использовали для трансформации клеток *E. coli* DH5 α . Для введения мутации (Val84Ile) использовали следующие праймеры:

прямой

5'-GTATTATCCCGTATTGACGCCGGGC-3'
и обратный

5'-GCCCGCGTCAATACGGGATAATAC-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°C при перемешивании (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 при 3000×g и 4°C и хранили при –20°C.

Выделение и очистка рекомбинатного фермента. 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 при скорости 10 000×g при 4°C в течение 15 мин. Полученный супернатант диализовали против 10 мМ Трис/HCl (pH 8,0) и использовали для дальнейшей очистки. Анионообменную хроматографию проводили на колонке SOURCE™ 15Q (10 см × 0,75 см², «GE Life Science»), уравновешенной тем же буфером; рекомбинантный препарат фермента элюировали в линейном градиенте (0–300 мМ NaCl, 2 мл/мин). Фракции, содержащие активный фермент, хранили при +4°C или замораживали при –20°C.

Измерение активности рекомбинантной β-лактамазы. Активность β-лактамазы по субстрату CENTA определяли на спектрофотометре «UV-1602» фирмы «Shimadzu» (Япония) при 25°C. Образование хромогенного продукта детектировали при длине волны 405 нм ($\Delta\epsilon_{405} = 6400 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$). Измерения активности проводили в 50 мМ Na-фосфатном буферном растворе (pH 7,0).

Определение K_m , V и $k_{\text{кат}}$. Раствор субстрата β-лактамазы CENTA (4 мМ в 50 мМ Na-фосфатном буфере, pH 7,0) и аликвоту фермента (10 мкл) добавляли к 50 мМ Na-фосфатному буферному раствору (pH 7,0). Общий объем смеси составлял 1 мл. Значения начальных скоростей 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 и V) определяли из графиков в координатах Лайнуивера–Берка. При расчетах считали, что концентрация активных центров ферментов соответствует концентрации фермента в реакционной смеси.

Определение K_I . Концентрированный раствор тазобактама (4 мМ) получали растворением определенной навески реагента в 50 мМ буферном

растворе фосфата Na (pH 7,0). Раствор CENTA (в 50 мМ Na-фосфатном буфере, pH 7,0), раствор ингибитора и аликвоту фермента (10 мкл) добавляли к 50 мМ Na-фосфатному буферному раствору (pH 7,0). Общий объем смеси составлял 1 мл. Значения начальной концентрации тазобактама составляли 0; 0,25; 0,05; 0,1 и 0,2 мкМ. Константы ингибирования определяли из графика, на котором экспериментальные данные были представлены в координатах ($K_{m, \text{ каж}}/[I]$). Каждое измерение активности проводили в трех повторах.

Результаты и обсуждение

Периплазматическая экспрессия генов β-лактамаз TEM-1 и TEM-171 в клетках *E. coli*. Гетерологическая экспрессия генов β-лактамаз в бактериях имеет много преимуществ по сравнению с выделением соответствующих белков из клинических образцов. Для получения рекомбинантных препаратов β-лактамаз (TEM-1 и TEM-171) в растворимой и активной формах был выбран метод экспрессии в бактериальную периплазму, окислительный потенциал которой способствует формированию стабильных дисульфидных связей. С этой целью был создан экспрессионный вектор pET-bla, содержащий ген устойчивости к канамицину в качестве селективного маркера, что позволяет избежать интерференции с собственной активностью β-лактамаз, определяющей устойчивость к ампициллину. Полноразмерный ген TEM-1 β-лактамазы, содержащий нативную сигнальную последовательность, обеспечивающую транспорт синтезированного белка в периплазму, был клонирован под контролем сильного T7-промотора по сайтам рестрикции NdeI и NotI, введенных методом ПЦР. Секвенирование показало, что нуклеотидные последовательности полностью соответствуют референсным последовательностям β-лактамаз из банка данных (<http://www.lahey.org/Studies/temtable.asp/>) и ни на одной из стадий клонирования не было введено случайных мутаций.

Направленный мутагенез β-лактамазы TEM-1. Созданная конструкция pET-bla вектора для TEM-1 β-лактамазы была использована для получения мутанта данного фермента (TEM-171), содержащего единичную замену валина на изолейцин в положении 84. В настоящее время в банке данных аминокислотных последовательностей β-лактамаз (<http://www.lahey.org/Studies/temtable.asp/>) описаны 204 уникальных фермента TEM-группы. При этом у пяти ферментов (TEM-116, TEM-157, TEM-162, TEM-171 и TEM-205) в положении 84 находится изолейцин вместо валина, причем только у β-лактамазы TEM-171 это

единственная замена (по сравнению с канонической последовательностью TEM-1). Данные о фенотипе данного фермента отсутствуют. Для создания TEM-171 использовали метод Quick Change. Метод заключается во введении нуклеотидной замены с помощью праймера в процессе ПЦР целой плазмиды. Дизайн праймеров был основан на том, что оба мутагенных праймера должны содержать желаемую мутацию и быть самокомплементарными для гибридизации на одном и том же участке на разных цепях плазмидной ДНК. Нуклеотидная замена должна находиться в середине праймера. Рестриктаза DpnI специфически расщепляет метилированную ДНК и тем самым позволяет убрать исходную матрицу ДНК, не содержащую мутаций. Данный метод характеризуется высокой эффективностью и простотой исполнения. Результаты секвенирования (для трех клонов) показали, что во всех клонках присутствует соответствующая однонуклеотидная замена (G/A) и что в процессе ПЦР не было введено никаких случайных мутаций.

Выделение и очистка β-лактамаз. Созданные штаммы *E. coli* (продуценты β-лактамаз TEM-1 и TEM-171) позволяют получать рекомбинантные препараты соответствующих ферментов в активной и растворимой формах. Очистка рекомбинантного белка после индукции ИПТГ из культуры клеток *E. coli* BL21(DE3)

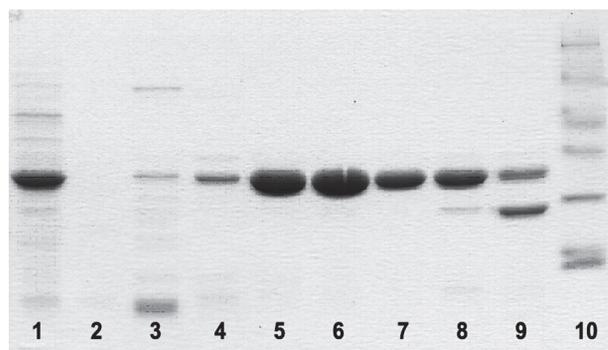


Рис. 1. ДСН-ПААГ-электрофорез в 12,5%-м геле фракций рекомбинантной β-лактамазы TEM-171 в процессе очистки: 1 – периплазматическая фракция после диализа; 2 – проскок; 3–9 – разные фракции, содержащие β-лактамазу, элюция в градиенте NaCl (0–0,3 М); 10 – белковые стандарты молекулярного веса

включала осмотический шок в 20%-й сахарозе для выделения периплазматической фракции с последующим диализом против 10 мМ Трис/HCl (pH 8,0). Выделение рекомбинантных β-лактамаз проводили методом анионообменной хроматографии на носителе SOURCE™ 15Q (GE Healthcare); β-лактамазы элюировали в солевом градиенте (0–0,3 М NaCl) при концентрации соли около 80 мМ. Степень чистоты полученных препаратов TEM-1 и TEM-171 составила не менее 95% по данным электрофореза (рис. 1). Характеристики процесса выделения и очистки представлены в табл. 1. Для подтверждения ами-

Таблица 1

Характеристика процессов выделения и очистки β-лактамаз TEM-1 и TEM-171 из клеток *E. coli* BL21(DE3)

Стадии выделения и очистки	Общая активность (А)	Удельная активность (А/мг _{белка})	Степень очистки	Выход, %
β-Лактамаза TEM-1				
Периплазматическая фракция	157	1,8	–	100
Диализ	144	2,1	1,2	92
Анионообменная хроматография, SOURCE™ 15Q	68	7,7	3,6	43
β-Лактамаза TEM-171				
Периплазматическая фракция	70	1,2	–	100
Диализ	63	1,5	1,3	90
Анионообменная хроматография, SOURCE™ 15Q	30	7,7	6,4	42

нокислотной последовательности рекомбинантных β -лактамаз использовали масс-спектральный анализ (выполнен в лаборатории системной биологии НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича докт. биол. наук В.Г. Згодой).

Общий выход очищенного рекомбинантного препарата составил около 25 мг с 1 л культуры клеток *E. coli* для β -лактамазы TEM-1 и 10 мг с 1 л культуры для TEM-171. Стоит отметить, что при одинаковых условиях культивирования, индукции, выделения и очистки периплазматическая фракция β -лактамазы TEM-171 содержит примерно в 2 раза меньше целевого белка, чем в случае TEM-1. Можно предположить, что мутация в положении 84 фермента TEM-171 влияет на процесс биосинтеза данного фермента в клетке (фолдинг, транслокацию в периплазму, процессинг сигнальной последовательности и др.).

Определение каталитических параметров рекомбинантных β -лактамаз TEM-1 и TEM-171. Цель данного этапа работы состояла в определении каталитических параметров (K_M , V , $k_{\text{кат}}$) полученных рекомбинантных форм β -лактамаз по хромогенному субстрату CENTA [13]. Данный субстрат является синтетическим субстратом β -лактамаз на основе цефалотина, при гидролизе которого образуется окрашенный продукт с пиком поглощения на 405 нм. В литературе имеются данные по кинетическим константам гидролиза CENTA лишь для ограниченного количества β -лактамаз. Значения каталитических параметров рекомбинантных β -лактамаз TEM-1 и TEM-171 представлены в табл. 2.

Т а б л и ц а 2

Каталитические параметры рекомбинантных β -лактамаз TEM-1 и TEM-171 в реакции гидролиза субстрата CENTA

β -Лактамаза	K_M , мкМ	$k_{\text{кат}}$, с ⁻¹	[E], нМ
TEM-1	24±2	109±2	10
TEM-171	23±2	102±2	5

Измеренные в настоящей работе величины K_M и $k_{\text{кат}}$ для рекомбинантных форм β -лактамаз по субстрату CENTA позволяют говорить о схожести каталитической эффективности обоих рекомбинантных ферментов в реакции гидролиза субстрата CENTA. Это свидетельствует о том, что замена валина в положении 84 на изолейцин не оказывает существенного влияния на конформацию активного центра фермента и пути передачи протона.

Изучение ингибирования β -лактамазы TEM-1 и TEM-171 тазобактамом. Изучено ингибирование рекомбинантных β -лактамаз TEM-1 и TEM-171 тазобактамом. В роли субстрата выступал CENTA. Каждое измерение активности проводили трижды. Полученные результаты не различались в сериях более чем на 7%. На рис. 2 представлены зависимости начальной скорости реакции от концентрации субстрата в координатах Лайнувера–Берка в присутствии различных концентраций тазобактама для рекомбинантных β -лактамаз TEM-1 и TEM-171. Линеаризацию проводили по методу наименьших квадратов. Анализ представленных результатов позволяет сделать вывод о конкурент-

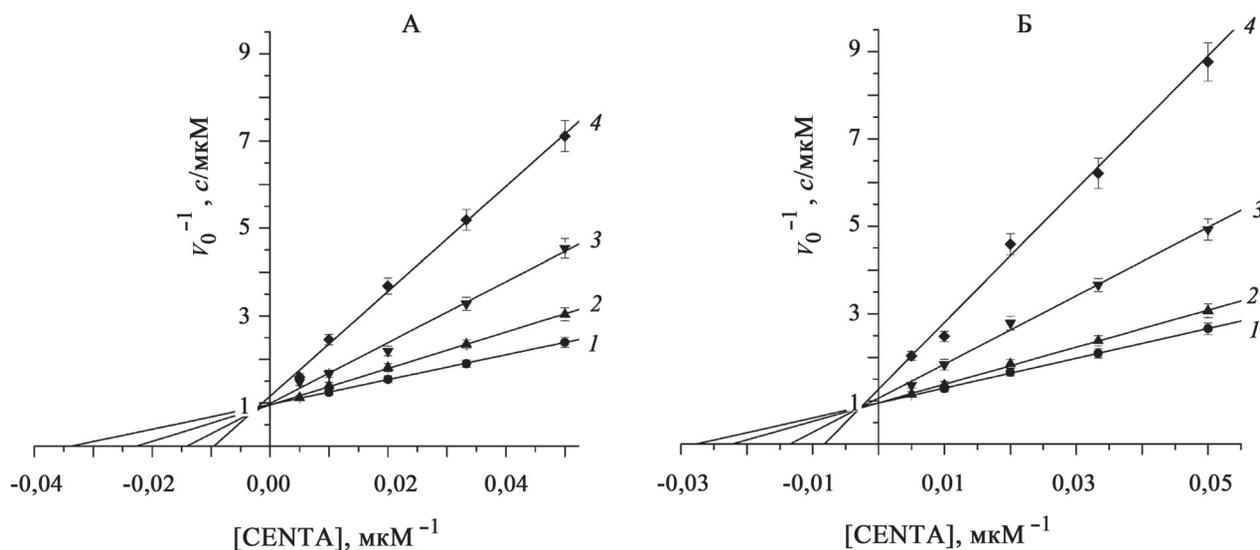


Рис. 2. Зависимость начальной скорости реакции гидролиза субстрата CENTA β -лактамазой TEM-1 (А) и TEM-171 (Б) от концентрации субстрата в координатах Лайнувера–Берка ($1/v_0$, $1/[S_0]$) при разной концентрации тазобактама: 1 – 0,025; 2 – 0,05; 3 – 0,1; 4 – 0,2 мкМ

ном ингибировании β-лактамаз TEM-1 и TEM-171 тазобактамом. Данный факт отражает структурное сходство тазобактама с β-лактамными антибиотиками (пенициллины и цефалоспорины), являющимися субстратами β-лактамаз.

Для определения константы ингибирования рекомбинантной β-лактамазы тазобактамом строили зависимость $K_M^{эфф}$ от концентрации ингибитора (рис. 3). В настоящее время в литературе отсутствуют данные по константам ингибирования β-лактамаз тазобактамом, измеренным по субстрату CENTA. Рассчитанные значения констант ингибирования (K_i) составили $0,057 \pm 0,004$ мкМ для β-лактамазы TEM-1 и $0,047 \pm 0,004$ мкМ для TEM-171. Полученные нами значения совпадают по порядку величины с ранее опубликованными данными для TEM-1 по субстрату нитроцефин ($0,014$ мкМ) [14].

Изучение термостабильности. Изучение термостабильности β-лактамаз TEM-1 и TEM-171 проводилось при 60°C в течение 3 ч. Было показано, что замена валина в положении 84 на изолейцин приводит к уменьшению стабильности фермента TEM-171 в 1,5 раза. Период полуинактивации при концентрации ферментов 1 мкМ составил 112 и

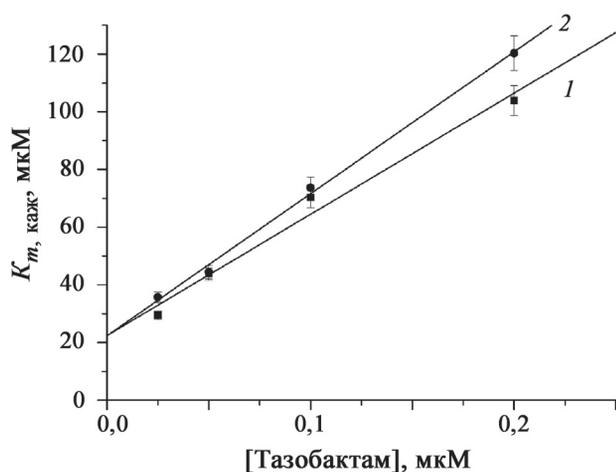


Рис. 3. Зависимость $K_M^{эфф}$ от концентрации тазобактама для рекомбинантных β-лактамаз TEM-1 (1) и TEM-171 (2)

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (проект № 15-14-00014).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Antimicrobial Resistance Global Report on surveillance 2014 World Health Organization (<http://www.who.int/drugresistance/en/>).
 2. Bush K. // Ann. N.Y. Acad. Sci. 2013. Vol. 1277. P. 84.
 3. Horn J.R., Shoichet B.K. // J. Mol. Biol. 2004. Vol. 336. P. 1283.

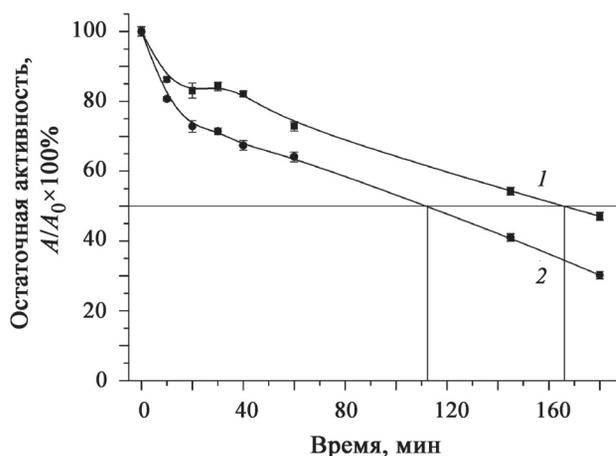


Рис. 4. Зависимость остаточной активности от времени для β-лактамаз TEM-1 (1) и TEM-171 (2). Концентрация ферментов 1 мкМ, 50 мМ натрий-фосфатный буфер (pH 7,0), температура инкубации 60°C

166 мин для TEM-171 и TEM-1 соответственно (рис. 4). В настоящее время проводится изучение механизма влияния мутации (Val84Ile) на стабильность методами молекулярного моделирования и рентгеноструктурного анализа [15].

Распространение в настоящее время антибиотикорезистентности, безусловно, связано с антропогенными факторами. Однако резистентность бактерий имеет более глубокие корни. Это явление отражает борьбу видов за ареал обитания и источники энергии и появилось намного раньше, чем человек начал использовать антибиотики. Наличие широкого полиморфизма у суперсемейства β-лактамаз, по-видимому, играет существенную роль в адаптации и выживании микроорганизмов в изменяющихся внешних условиях. Детальное изучение влияния мутаций на свойства β-лактамаз позволит получить новые фундаментальные знания о природе полиморфизма, а также найти новые способы преодоления резистентности микроорганизмов к антибиотикам.

Выражаем благодарность группе Виктора Ламзина из Европейской Молекулярно-Биологической Лаборатории (ЕМБЛ) за обсуждение полученных результатов

4. Bradford P. // Clin. Microbiol. Reviews. 2001. Vol. 14. P. 933.
 5. Datta N., Kontomichalou P. // Nature. 1965. Vol. 208. N 5007. P. 239.
 6. Wang X., Minasov G., Blázquez J., Caselli E., Prati F., Shoichet B.K. // Biochemistry. 2003. Vol. 42. N 28. P. 8434.

7. Wang X., Minasov G., Shoichet B.K. // J. Mol. Biol. 2002. Vol. 320. P. 85.
8. Reichmann D., Rahat O., Albeck S., Meged R., Dym O., Schreiber G. // Proc. Natl. Acad. Sci. 2005. Vol. 102. P. 57.
9. Stec B. // Acta Crystallogr. Sect. D. 2005. Vol. 61. P. 1072.
10. Fonze E. // Acta Crystallogr. Sect. D. 1995. Vol. 51. P. 682.
11. Dellus-Gur E., Toth-Petroczy A., Elias M., Tawfik D.S. // J. Mol. Biol. 2013. Vol. 425. P. 2609.
12. Richman D.D. // Nature. 1995. Vol. 374. P. 494
13. Bebrone C., Moali C., Mahy F., Rival S., Docquier J.D., Rossolini G.M., Fastrez J., Pratt R.F., Frère J.M., Galieni M. // Antimicrob. Agents Chemother. 2001. Vol. 45. N 6. P. 1868.
14. Caporale B., Franceschini N., Perilli M., Segatore B., Rossolini G.M., Amicosante G. // Antimicrob Agents Chemother. 2004. Vol. 48. N. 9. P. 3579.
15. Grigorenko V.G., Rubtsova M.Y., Egorov A.M., Carolan C.G., Kallio J., Lamzin V.S. // FEBS Journal. 2013. Vol. 280. Suppl. 1. P. 373

Поступила в редакцию 01.08.15

STUDY OF CATALYTIC PROPERTIES OF RECOMBINANT β -LACTAMASES TEM-1 AND TEM-171 OF MOLECULAR CLASS A

V.G. Grigorenko, I.P. Andreeva, M.Yu. Rubtsova, V.V. Burmakin, I.V. Uporov, A.M. Egorov

(Department of Chemical Enzymology, Faculty of Chemistry, M.V. Lomonosov Moscow State University)

In this work preparation of recombinant β -lactamases TEM-1 and TEM-171 of molecular class A, characterized by a single amino acid substitution of valine at position 84 to isoleucine (Val84Ile), was studied. For the first time kinetic parameters for TEM-171 have been obtained with chromogenic substrate CENTA: $K_M^{\text{eff}} = 23 \mu\text{M}$, $k_{\text{cat}} = 102 \text{ s}^{-1}$. Competitive type of β -lactamases inhibition by tazobactam was ascertained. The inhibition constants for tazobactam with CENTA as a substrate were as follows: $0.057 \mu\text{M}$ and $0.047 \mu\text{M}$ for recombinant β -lactamase TEM-1 and TEM-171, respectively. It was shown that Val84Ile substitution leads to a decrease of β -lactamase TEM-171 thermostability by 1.5 times.

Key words: recombinant β -lactamase TEM-1, TEM-171, CENTA, kinetic parameters, tazobactam, competitive type of inhibition.

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); Рубцова Майя Юрьевна – вед. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, канд. хим. наук (mrubtsova@gmail.com); Бурмакин Владислав Васильевич – студент химического факультета МГУ (darkvaider@list.ru); Упоров Игорь Владимирович – вед. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, канд. хим. наук (iuporov@gmail.com); Егоров Алексей Михайлович – глав. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, докт. биол. наук (alex.m.egorov@gmail.com).