

УДК 577.1

# Аддитивность стабилизирующего эффекта единичных аминокислотных замен в тройных мутантах рекомбинантной формиатдегидрогеназы из сои *Glycine max*

А. А. Алексеева<sup>1,2</sup>, И. С. Каргов<sup>2,3</sup>, С. Ю. Клейменов<sup>1,4</sup>, С. С. Савин<sup>1,2,3</sup>, В. И. Тишков<sup>1,2,3\*</sup><sup>1</sup>Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, 119071, Москва, Ленинский просп., 33, корп. 2<sup>2</sup>ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», 109559, Москва, ул. Цимлянская, 16, оф. 96<sup>3</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3<sup>4</sup>Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, 119334, Москва, ул. Вавилова, 26

\*E-mail: vitishkov@gmail.com

Поступила в редакцию 03.07.2015

**РЕФЕРАТ** Ранее нами было показано, что аминокислотные замены в рекомбинантной формиатдегидрогеназе сои *Glycine max* (SoyFDH) Ala267Met и Ala267Met/Phe272Val (Алексеева и соавт., Биохимия, 2012), Phe290Asp, Phe290Asn и Phe290Ser (Alekseeva et al., Prot. Eng. Des. Select, 2012) приводят к значительному (до 30–100 раз) увеличению термостабильности фермента. Методом направленного мутагенеза в двойной мутант SoyFDH Ala267Met/Phe272Val были введены замены Phe290Asp, Phe290Asn и Phe290Ser. Объединение трех замен не привело к заметному изменению каталитических свойств мутантного фермента. Стабильность полученных тройных мутантов изучали по кинетике термоинактивации и с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии. Показано, что термостабильность новых мутантных SoyFDH намного выше, чем у их предшественников. По стабильности лучшая форма SoyFDH – Ala267Met/Phe272Val/Phe290Asp – оказалась сравнимой с наиболее стабильными формиатдегидрогеназами дикого типа из других источников. Результаты, полученные обоими методами, свидетельствуют о большом синергическом вкладе отдельных аминокислотных замен в стабилизацию фермента.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** белковая инженерия, многоточечные мутанты, рациональный дизайн, стабилизация, стабильность, синергический эффект, формиатдегидрогеназа, *Glycine max*.

## ВВЕДЕНИЕ

NAD(P)<sup>+</sup>-зависимые формиатдегидрогеназы ([1.2.1.2], FDH) найдены в бактериях, дрожжах, микроскопических грибах и растениях [1–3], однако FDH из растений гораздо менее изучены, чем ферменты из микроорганизмов. В нашей лаборатории активно изучаются растительные рекомбинантные формиатдегидрогеназы, в том числе и ФДГ из сои *Glycine max* (SoyFDH) [3–7]. Создана генетическая конструкция, которая позволила экспрессировать SoyFDH в клетках *Escherichia coli* в активной и растворимой форме [8]. Повышенный интерес к этому ферменту обусловлен тем, что значения констант Михаэлиса

у SoyFDH как по NAD<sup>+</sup>, так и по формиату ниже, чем у формиатдегидрогеназ из других источников (табл. 1). Систематические исследования различных формиатдегидрогеназ [2] и анализ взаимосвязи структура–функция позволили выявить ряд аминокислотных остатков, влияющих на стабильность и каталитические свойства формиатдегидрогеназы сои [3–7]. Методом направленного мутагенеза получено более 20 мутантных форм SoyFDH, больше половины из которых обладали более высокой температурной стабильностью, чем фермент дикого типа при сохранении низких значений констант Михаэлиса. Наиболее интересные результаты полу-

чены при использовании таких подходов по стабилизации ферментов, как заполнение полости внутри белковой глобулы [4] и замена гидрофобного остатка на гидрофильные на поверхности белковой глобулы [5, 6]. С помощью первого подхода получены SoyFDH с заменой одного и двух аминокислотных остатков – Ala267Met и Ala267Met/Phe272Val соответственно. Причем двойной мутант по термостабильности заметно превосходил своего предшественника [4]. В случае второго подхода гидрофобный остаток Phe290, расположенный на поверхности кофермент-связывающего домена белковой глобулы, был заменен на восемь других аминокислот [5, 6]. В представленной работе в результате введения в двойной мутант SoyFDH Ala267Met/Phe272Val точечных замен Phe290Asp, Phe290Asn и Phe290Ser получены три тройных мутанта. Предполагалось, что замена Phe290Asp, обеспечивающая наиболее сильный эффект стабилизации, позволит получить тройной мутант с наиболее высокой стабильностью. Два остальных тройных мутанта получены, чтобы выяснить, как различия в эффекте стабилизации в положении 290 будут влиять на общую стабильность и каталитические свойства SoyFDH с тремя аминокислотными заменами.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Для генно-инженерных экспериментов использовали реактивы марки Molecular Biology Grade. В микробиологических экспериментах применяли бактотриптон, дрожжевой экстракт и агар (Difco, США), глицерин (99.9%) и хлорид кальция (ultra pure), гидрофосфат калия, дигидрофосфат натрия (pure for analysis), лизоцим (Fluka/BioChemika, Швейцария), лактозу (analytical grade), ампициллин и хлорамфеникол (Sigma, США), глюкозу и хлорид натрия («ч.д.а.», «Хеликон», Россия). Эндонуклеазы рестрикции, ДНК-лигазу фага T4 и ДНК-полимеразу Pfu фирмы Fermentas (Литва) использовали для клонирования фрагментов ДНК и направленного мутагенеза. ДНК из агарозного геля и плазмиды из клеток *E. coli* выделяли с использованием наборов реагентов фирмы Fermentas (Литва). Олигонуклеотиды для проведения полимеразной цепной реакции и секвенирования синтезированы фирмой «Синтол» (Россия). В этих экспериментах использовали воду, очищенную на установке MilliQ (Millipore, США).

Все реактивы, использованные при электрофорезе белков, произведены фирмой Bio-Rad (США). Для выделения фермента и изучения его свойств применяли  $\text{NAD}^+$  с чистотой не менее 98% (AppliChem, Германия), формиат натрия и EDTA (Merck, Германия), азид натрия (Sigma, Германия), сульфат аммония марки «х.ч.» («Диам», Россия), ди-

гидрофосфат натрия, гидрофосфат натрия и мочевины марки «ч.д.а.» (РеаХим, Россия).

### Проведение реакции направленного мутагенеза

Нуклеотидные замены, обеспечивающие замены Phe290Asp, Phe290Asn и Phe290Ser в аминокислотной последовательности SoyFDH, вводили, как описано ранее [5], однако в качестве исходной матрицы использовали не плазмиду pSoyFDH2 с геном SoyFDH дикого типа, а плазмиду pSoyFDH2\_M1M2. Эта плазида содержит ген, кодирующий SoyFDH с заменами Ala267Met и Phe272Val.

Плазмиды, кодирующие каждый из мутантов, выделяли из трех клонов. Правильность введения мутаций контролировали с помощью секвенирования плазмидной ДНК в Центре коллективного пользования «Геном» (Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН).

### Экспрессия мутантных форм SoyFDH в клетках

#### *E. coli*

SoyFDH дикого типа и ее мутантные формы экспрессировали в клетках *E. coli* BL21(DE3) CodonPlus/pLysS. Для получения штамма-продуцента клетки трансформировали соответствующей плазмидой и высевали на чашки Петри с агаризованной средой, содержащей ампициллин (150 мкг/мл) и хлорамфеникол (25 мкг/мл). Для приготовления посевного материала отбирали единичную колонию с чашки и культивировали ее в течение ночи при 30°C в 4 мл модифицированной среды 2YT (дрожжевой экстракт 10 г/л, бактотриптон 16 г/л, дигидрофосфат натрия 1.5 г/л, гидрофосфат калия 1 г/л, pH 7.5) в присутствии 150 мкг/мл ампициллина и 25 мкг/мл хлорамфеникола. Далее клетки пересеивали на свежую среду (разбавление 1 : 100) и культивировали при 37°C до величины  $A_{600} \approx 0.6-0.8$ . Посевной материал (10% от общего объема среды) вносили в конические колбы объемом 1 л с отбойниками. Далее клетки культивировали при 30°C и 80–90 об/мин до величины поглощения  $A_{600} = 0.6-0.8$ . Затем клетки индуцировали, добавляя раствор лактозы (300 г/л) до конечной концентрации 20 г/л. После индукции клетки культивировали в течение 17 ч и затем осаждали на центрифуге Eppendorf 5403 (20 мин, 5000 об/мин, +4°C). Полученный осадок ресуспендировали в 0.1 М натрий-фосфатном буфере pH 8.0 в соотношении 1 : 4 (масс.). Полученную суспензию замораживали и хранили при –20°C.

### Выделение и очистка мутантных ферментов

Для выделения мутантных SoyFDH 20% суспензию клеток в 0.1 М натрий-фосфатном буфере pH 8.0 подвергали двум циклам замораживания-оттаива-

ния, затем клетки разрушали с использованием ультразвукового дезинтегратора Branson Sonifier 250 (Германия) при постоянном охлаждении. Осадок удаляли центрифугированием на центрифуге Eppendorf 5804R (11000 об/мин, 30 мин).

Процедура очистки фермента включала высаживание балластных белков сульфатом аммония (40% от насыщения), осаждение целевого белка (при концентрации сульфата аммония 85% от насыщения) и его последующее перерастворение в растворе, содержащем 45% сульфата аммония, гидрофобную хроматографию на фенолсефарозе и обессоливание на колонке с Сефадексом G-25 [4, 5]. Чистоту препарата контролировали с помощью аналитического электрофореза в 12% полиакриламидном геле в присутствии 0.1% додецилсульфата натрия (аппаратура для электрофореза фирмы Bio-Rad).

#### Измерение активности формиаатдегидрогеназы

Активность фермента определяли спектрофотометрически по накоплению NADH при длине волны 340 нм ( $\epsilon_{340} = 6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) на спектрофотометре Shimadzu UV1800PC при 30°C в 0.1 М натрий-фосфатном буфере pH 7.0, содержащем 0.3 М формиат натрия и 0.4 мг/мл NAD<sup>+</sup>.

#### Определение констант Михаэлиса

Константы Михаэлиса по NAD<sup>+</sup> и формиату определяли спектрофотометрически, измеряя зависимость активности фермента от концентрации одного из субстратов в диапазоне от 0.3 до 6–7  $K_M$  при насыщающих концентрациях второго субстрата ( $> 20 K_M$ ). Точную концентрацию исходных растворов NAD<sup>+</sup> измеряли при длине волны 260 нм ( $\epsilon_{260} = 17800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Точную концентрацию формиата натрия определяли энзиматически с помощью формиатдегидрогеназы по образованию NADH в результате окисления формиат-иона до CO<sub>2</sub>. В кварцевую кювету спектрофотометра (общий и рабочий объемы 4 и 2 мл соответственно) добавляли 50 мкл раствора NAD<sup>+</sup> (20 мг/мл в 0.1 М фосфатном буфере, pH 8.0), 20 мкл раствора формиатдегидрогеназы (50 ед./мл) и 0.1 М фосфатный буфер, pH 8.0 до общего объема 1.96 мл. Кювету термостатировали 15 мин при 37°C, фиксировали поглощение на 340 нм. Из мерной колбы с раствором формиата натрия в 0.1 М фосфатном буфере, pH 7.0, приготовленного по навеске из расчета финальной концентрации 3 М, стеклянной пипеткой с рабочим объемом 0.1 мл отбирали 0.1 мл раствора, добавляли в мерную колбу объемом 100 мл с 0.1 М фосфатным буфером, pH 8.0 и доводили объем по метке до 100 мл тем же буфером. Полученный раствор перемешивали, отбирали пробу объемом 40 мкл раствора и вносили в кювету с реакционной смесью. По завершении

реакции (15–20 мин) измеряли поглощение раствора, из которого вычитали величину начального поглощения, и из значения разницы рассчитывали точную концентрацию формиата натрия. Значения  $K_M$  определяли методом нелинейной регрессии, используя программу Origin Pro 8.5.

#### Определение величины каталитических констант

Величины каталитических констант нескольких препаратов фермента с различной активностью рассчитывали, определяя концентрации активных центров по тушению флуоресценции фермента NAD<sup>+</sup> и азид-ионом [7]. Измерения проводили в 0.1 М натрий-фосфатном буфере pH 7.0, на флуориметре Cary Eclipse (Varian, США). Значение каталитической константы определяли как тангенс угла наклона зависимости активности фермента от концентрации активных центров методом линейной регрессии, используя программу Origin Pro 8.5.

#### Изучение термостабильности по кинетике термоинактивации

Термостабильность фермента анализировали в 0.1 М натрий-фосфатном буфере pH 7.0, содержащем 0.01 М EDTA. Для каждого эксперимента готовили серию из пластиковых пробирок объемом 1.5 мл по 50 мкл раствора фермента (0.2 мг/мл) в каждой. Пробирки помещали в предварительно прогретый до необходимой температуры водный термостат (46–60°C, точность термостатирования  $\pm 0.1^\circ\text{C}$ ). В определенные моменты времени отбирали по одной пробирке и переносили в лед на 5 мин, после чего пробирку центрифугировали в течение 3 мин при 12000 об/мин на центрифуге Eppendorf 5415D. Остаточную активность формиатдегидрогеназы измеряли как описано выше. Константу скорости термоинактивации  $k_{in}$  определяли как тангенс угла наклона зависимости натурального логарифма величины остаточной активности от времени (полулогарифмические координаты  $\ln(A/A_0) - t$ ) методом линейной регрессии, используя программу Origin Pro 8.5.

#### Изучение термостабильности ферментов методом дифференциальной сканирующей калориметрии

Эксперименты по дифференциальной сканирующей калориметрии проводили на дифференциальном адиабатическом сканирующем микрокалориметре ДАСМ-4 (НПО «Биоприбор», Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Россия). Рабочий объем капиллярных калориметрических ячеек из платины составлял 0.48 мл. С целью предотвращения образования пузырьков

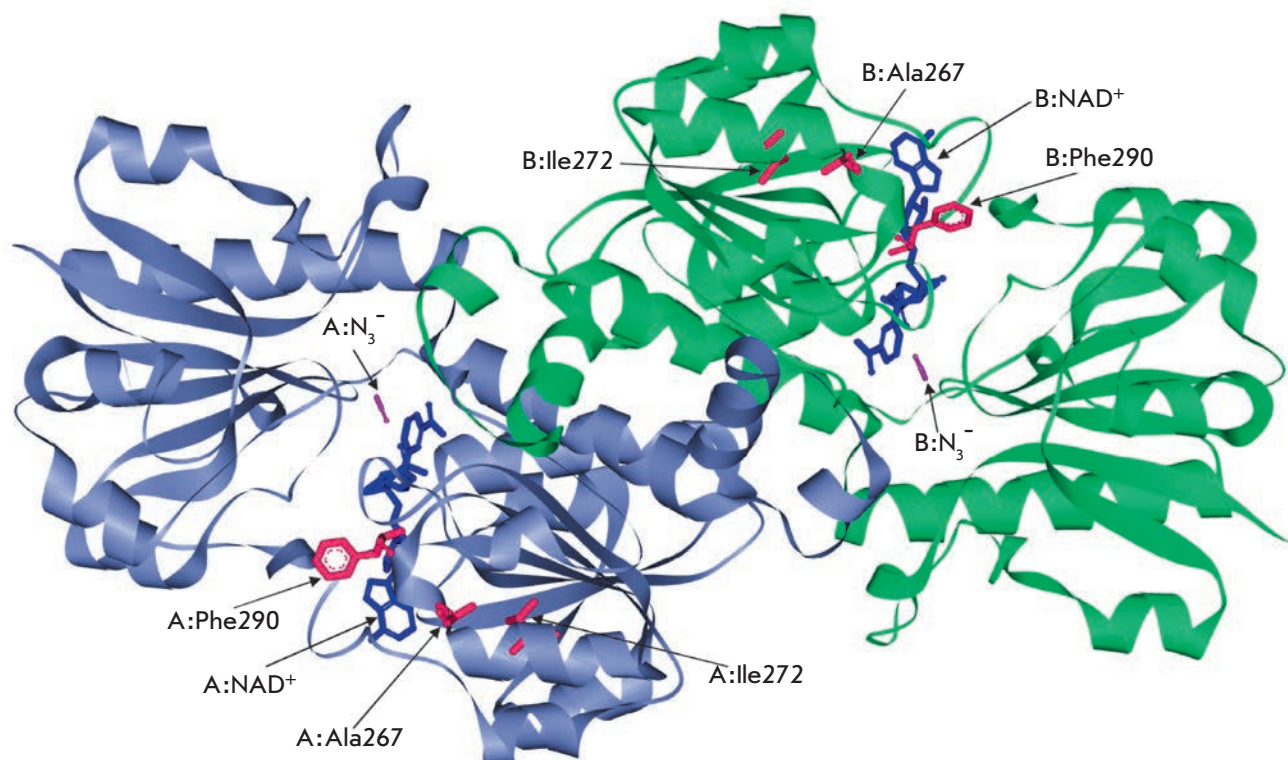


Рис. 1. Трехмерная структура тройного комплекса [SoyFDH-NAD<sup>+</sup>-N<sub>3</sub><sup>-</sup>].

воздуха и закипания растворов при повышении температуры в ячейках калориметра поддерживали избыточное давление 2.2 атм. Калибровку приборов ДАСМ-4 осуществляли, подавая на одну ячейку фиксированную мощность ( $\Delta W = 25$  мкВт).

Перед проведением калориметрического эксперимента определяли собственный дрейф показаний прибора от температуры. При измерениях в контрольную ячейку помещали 0.1 М натрий-фосфатный буфер pH 7.0, а в рабочую – раствор SoyFDH в том же буфере. Концентрация ферментов – 2.0 мг/мл, а скорость прогрева – 1°C/мин.

Обратимость тепловой денатурации проверяли с помощью повторного сканирования образца после его охлаждения до 10–12°C непосредственно в калориметре. Отсутствие пика денатурации при повторном измерении подтверждало ее необратимый характер.

Обработку и анализ кривых денатурации проводили по стандартной методике с помощью специальных макросов, используя программу Matlab 8.0. Перед определением характеристик денатурации из полученных данных вычитали собственный дрейф калориметра и ступенчатое изменение теплоемкости, связанное с полной денатурации. Калориметрическую энтальпию денатурации ( $\Delta H_{\text{кал}}$ ) рассчитывали из площади

под кривой зависимости избыточной теплоемкости белка от температуры; температуру денатурации (плавления)  $T_m$  – как температуру максимума на той же кривой. Погрешность при расчете  $\Delta H_{\text{кал}}$  составляла 5–8%. Экспериментальная ошибка измерения  $T_m$  не превышала 0.2°C.

#### Компьютерное моделирование

Структуру SoyFDH анализировали с помощью пакета программ Accelrys Discovery Studio 2.1. Этот же пакет использовали для получения изображений белковой глобулы.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как уже отмечалось, тройные мутанты SoyFDH были получены в результате введения трех аминокислотных остатков – Asp, Asn и Ser в 290-е положение двойного мутанта с заменами Ala267Met/Ile272Val. На рис. 1 показана структура тройного комплекса [SoyFDH-NAD<sup>+</sup>-N<sub>3</sub><sup>-</sup>] с указанием положения в белковой глобуле остатков Ala267, Ile272 и Phe290, выбранных для направленного мутагенеза. Из этого рисунка видно, что все три остатка расположены в коферментсвязывающем домене, однако первые два остатка намного дальше удалены от молекулы NAD<sup>+</sup>, чем остаток Phe290. Замены в 290-м положении гораздо заметнее из-

Таблица 1. Кинетические параметры мутантных форм формиатдегидрогеназы из сои в сравнении с ферментами из других источников

Фермент	$k_{cat}$ , с <sup>-1</sup>	$K_M^{formate}$ , мМ	$K_M^{NAD^+}$ , мкМ	$k_{cat}/K_M^{NAD^+}$ , (мкМ с) <sup>-1</sup>	$k_{cat}/K_M^{formate}$ , (мМ с) <sup>-1</sup>	Ссылка
wt-SoyFDH	2.9	1.5	13.3	0.22	1.93	[4–6]
SoyFDH M1 (A267M)	5.0	2.1	9.9	0.51	2.38	[4]
SoyFDH M1+M2 (A267M/I272V)	2.2	2.4	13.3	0.17	0.92	[4]
SoyFDH M3 (F290N)	2.8	4.5	14.0	0.40	1.02	[5]
SoyFDH M4 (F290D)	5.1	5.0	12.8	0.20	0.62	[5]
SoyFDH M5 (F290S)	4.1	4.1	9.1	0.45	1.00	[5]
SoyFDH M1+M2+M3 (A267M/I272V/F290N)	3.2 ± 0.2	2.2 ± 0.3	14.1 ± 0.7	0.23	1.45	Данная работа
SoyFDH M1+M2+M4 (A267M/I272V/F290D)	2.9 ± 0.2	2.8 ± 0.4	20.3 ± 1.3	0.14	1.04	Данная работа
SoyFDH M1+M2+M5 (A267M/I272V/F290S)	3.7 ± 0.1	2.3 ± 0.3	16.1 ± 0.4	0.23	1.61	Данная работа
wt-AthFDH	3.8	2.8	50	0.08	1.36	[8]
wt-LjaFDH	1.2	6.1	25.9	0.05	0.20	[9]
wt-CboFDH	3.7	5.9	45	0.08	0.63	[10, 11]
wt-MorFDH	7.3	7.5	80	0.09	0.97	[2]
wt-PseFDH	7.3	6.5	65	0.11	1.12	[2]
PseFDH GAV	7.3	6	35	0.21	1.22	[2, 3]
PseFDH SM4	7.3	3.2	41	0.18	2.28	Собственные данные

меняли как каталитические свойства, так и температурную стабильность, чем замены в положениях 267 и 272 [4–6]. Предположили, что объединение трех аминокислотных замен позволит получить еще более стабильную мутантную SoyFDH. В дальнейшем для удобства замены Ala267Met, Ile272Val, Phe290Asn, Phe290Asp и Phe290Ser обозначили как M1, M2, M3, M4 и M5 соответственно.

### Получение мутантных форм SoyFDH

Замены нуклеотидов, обеспечивающие возникновение требуемых мутаций, осуществляли с помощью полимеразной цепной реакции. Выделяли по три плазмиды для каждого из трех мутантов. По данным секвенирования во всех плазмидах ген *soyfdh* содержал только требуемые мутации. Плазмидами, кодирующими ген *soyfdh* с мутациями, приводящими к заменам аминокислот (A267M/I272V/F290N), (A267M/I272V/F290D) и (A267M/I272V/F290S), трансформировали штамм *E. coli* BL21(DE3) CodonPlus/pLysS. Показано, что все три мутантные SoyFDH экспрессировались в рекомбинантных штаммах в активной и растворимой форме. Согласно данным аналитического электрофореза в полиакри-

ламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия чистота выделенных препаратов SoyFDH составила не менее 95%.

### Кинетические свойства ферментов

В табл. 1 представлены значения каталитической константы и констант Михаэлиса по NAD<sup>+</sup> и формиату трех новых многоточечных мутантных SoyFDH, а также аналогичные значения для мутантов-предшественников и некоторых других формиатдегидрогеназ бактерий, дрожжей и растений. Из табл. 1 видно, что введение дополнительной замены в 290-е положение двойного мутанта практически не влияет на константу Михаэлиса по формиату, в то время как значение  $K_M$  по NAD<sup>+</sup> или сравнимо, или выше, чем у двойного мутанта-предшественника. Эти данные хорошо коррелируют с тем фактом, что все мутируемые остатки расположены в коферментсвязывающем домене. Каталитическая константа у двойного мутанта меньше, чем у точечных мутантов с заменой в 290-м положении. Объединение трех замен приводит к тому, что величина  $k_{cat}$  у тройных мутантов или сравнима, или выше, чем у двойного, но меньше, чем при точечных заменах

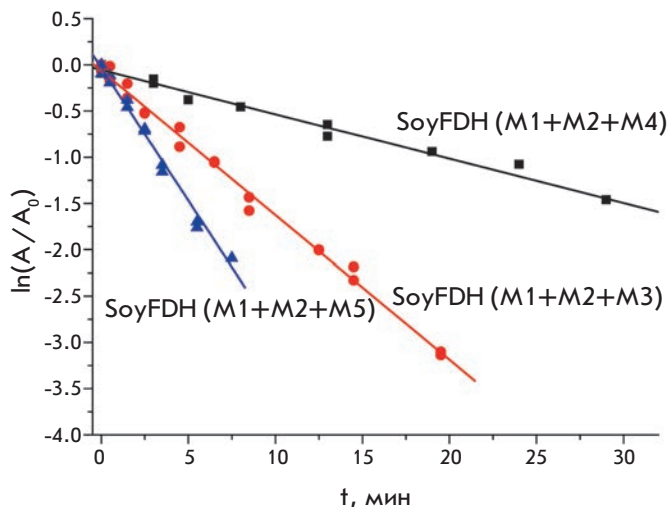


Рис. 2. Зависимость натурального логарифма остаточной активности многоточечных мутантных SoyFDH от времени при 64°C, 0.1 М натрий-фосфатный буфер pH 7.0. M1 – Ala267Met, M2 – Ile272Val, M3 – Phe290Asn, M4 – Phe290Asp, M5 – Phe290Ser

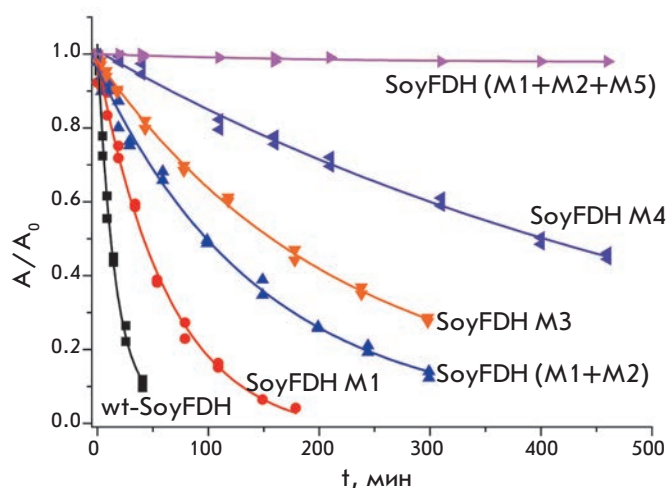


Рис. 3. Зависимость остаточной активности SoyFDH дикого типа (wt-SoyFDH) и некоторых мутантных форм от времени при 54°C, 0.1 М натрий-фосфатный буфер pH 7.0. M1 – Ala267Met, M2 – Ile272Val, M3 – Phe290Asn, M4 – Phe290Asp, M5 – Phe290Ser

Phe290Asp и Phe290Asn. Также следует отметить отсутствие корреляции между каталитическими свойствами двойного, тройных и точечных мутантов. Например, мутант SoyFDH Phe290Asp имеет самое высокое значение  $k_{cat}$  среди точечных мутантов с заменой в 290-м положении, а тройной мутант, также содержащий эту замену, имеет самую низкую среди многоточечных мутантов каталитическую константу.

Обобщая сказанное, можно сделать вывод, что у SoyFDH с заменами Ala267Met/Ile272Val/Phe290Asn и Ala267Met/Ile272Val/Phe290Ser кинетические параметры и каталитические свойства остались на уровне фермента дикого типа и мутантных форматдегидрогеназ из *Pseudomonas* sp. 101 – PseFDH GAV и PseFDH SM4 (табл. 1), а у мутанта SoyFDH – A267M/I272V/F290D – эти параметры немного ухудшились, но остались все же лучше, чем у CboFDH, широко используемой в настоящее время.

### Изучение температурной стабильности мутантных SoyFDH по кинетике термоинактивации

Кинетику термоинактивации мутантных SoyFDH с заменами Ala267Met/Ile272Val/Phe290Asn и Ala267Met/Ile272Val/Phe290Ser изучали в диапазоне температур 58–64°C, а SoyFDH Ala267Met/Ile272Val/Phe290Asp – в интервале 60–66°C. Выбор интервала температур определялся более высокой стабильностью последнего мутанта, поэтому для достижения временных интервалов, за которые происходит такое же, как и у других мутантов, падение активности, приходилось использовать бо-

лее высокие температуры. Во всем диапазоне температур кинетика инактивации соответствовала кинетике реакции первого порядка. Из величины тангенсов углов наклона этих прямых были рассчитаны константы скорости термоинактивации. Величина константы скорости инактивации не зависела от концентрации фермента во всем исследованном диапазоне температур, что свидетельствовало об истинно мономолекулярном механизме процесса термоинактивации. На рис. 2 приведена зависимость натурального логарифма остаточной активности трех новых мутантных ферментов от времени при температуре 64°C. Видно, что мутантная SoyFDH с заменами Ala267Met/Ile272Val/Phe290Asp обладает более высокой стабильностью, чем два других тройных мутанта. К сожалению, кривые инактивации мутантов-предшественников невозможно получить при этой температуре, так как в этих условиях они почти полностью инактивировались менее чем за 5 мин. Для наглядности эффекта стабилизации на рис. 3 представлены зависимости остаточной активности нескольких мутантных SoyFDH от времени при 54°C. Видно, что SoyFDH Ala267Met/Ile272Val/Phe290Asp практически не инактивируется в течение почти 8 ч, в то время как период полуинактивации фермента дикого типа и мутантных SoyFDH с заменами Ala267Met, Ala267Met/Ile272Val и Phe290Asp составляет 19, 56, 153 и 460 мин соответственно. Таким образом, можно говорить о большом аддитивном эффекте, который замена в 290-м положении, введен-

ная в двойной мутант SoyFDH Ala267Met/Ile272Val, оказывает на увеличение термостабильности фермента.

На рис. 4 представлены температурные зависимости констант скорости термоинактивации мутантных SoyFDH с тройными заменами и фермента дикого типа в координатах  $\ln(k_{in}/T)$  от  $1/T$ , где  $T$  – температура в градусах Кельвина. Данные координаты позволяют получить линейную анаморфозу уравнения зависимости константы скорости от температуры для теории активированного комплекса [12]:

$$\ln\left(\frac{k_{in}}{T}\right) = \ln\left(\frac{k_B}{h}\right) + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} - \frac{\Delta H^\ddagger}{RT} = const - \frac{\Delta H^\ddagger}{R} \frac{1}{T},$$

где  $k_B$  и  $h$  – константы Больцмана и Планка соответственно,  $R$  – универсальная газовая постоянная, а  $\Delta H^\ddagger$  и  $\Delta S^\ddagger$  активационные параметры.

Линейная форма полученных зависимостей говорит о том, что зависимость константы скорости термоинактивации нативной SoyFDH и мутантных форм действительно описывается уравнением теории активированного комплекса.

В табл. 2 приведены численные значения активационных параметров  $\Delta H^\ddagger$  и  $\Delta S^\ddagger$  процесса термоинактивации, рассчитанных из зависимостей констант скорости термоинактивации от температуры с использованием

уравнения из теории активированного комплекса. Видно, что величины энтальпии  $\Delta H^\ddagger$  и энтропии  $\Delta S^\ddagger$  активации фермента с тройной заменой Ala267Met/Ile272Val/Phe290Asp – самые высокие среди всех исследованных мутантных форм SoyFDH

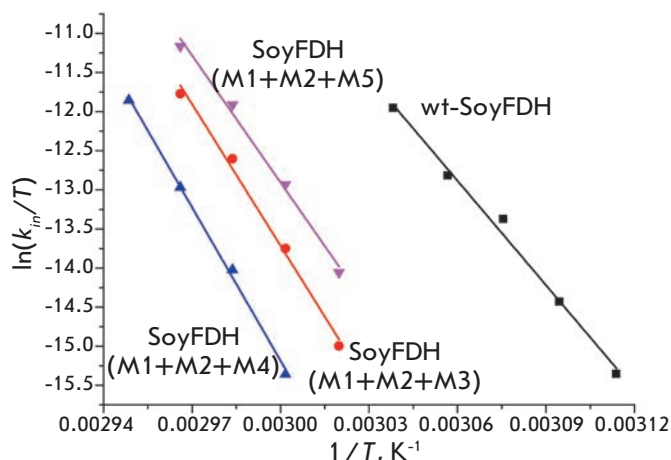


Рис. 4. Зависимость констант скорости термоинактивации мутантных SoyFDH и фермента дикого типа от температуры в координатах  $\ln(k_{in}/T) - 1/T, K^{-1}$ . 0.1 М натрий-фосфатный буфер pH 7.0. M1 – Ala267Met, M2 – Ile272Val, M3 – Phe290Asn, M4 – Phe290Asp, M5 – Phe290Ser

Таблица 2. Активационные параметры процесса термоинактивации различных мутантных SoyFDH, фермента дикого типа и формиатдегидрогеназ дикого типа из различных источников (0.1 М натрий-фосфатный буфер pH 7.0)

Фермент	$\Delta H^\ddagger$ , кДж/моль	$\Delta S^\ddagger$ , Дж/(моль К)	Ссылка
wt-SoyFDH	370 ± 20	830 ± 60	[4]
SoyFDH M1 (A267M)	400	900	[4]
SoyFDH M1+M2 (A267M/I272V)	450 ± 30	1040 ± 80	[4]
SoyFDH M3 (F290N)	450 ± 20	1050 ± 60	[5]
SoyFDH M4 (F290D)	520 ± 30	1240 ± 70	[5]
SoyFDH M5 (F290S)	440 ± 20	1020 ± 70	[5]
SoyFDH M1+M2+M3 (A267M/I272V/F290N)	500 ± 30	1190 ± 90	Данная работа
SoyFDH M1+M2+M4 (A267M/I272V/F290D)	540 ± 20	1310 ± 50	Данная работа
SoyFDH M1+M2+M5 (A267M/I272V/F290S)	450 ± 30	1050 ± 80	Данная работа
wt-AthFDH*	490	1200	[2]
wt-PseFDH*	540	1320	[2]
wt-CboFDH*	500	1360	[13]
wt-SceFDH*	420	н.д.**	[14]

\*AthFDH, PseFDH, CboFDH, SceFDH – формиатдегидрогеназы из растений *Arabidopsis thaliana*, бактерий *Pseudomonas* sp. 101, дрожжей *Candida boidinii* и *Saccharomyces cerevisiae* соответственно.

\*\* н.д. – нет данных.

и практически такие же, как и у одной из самых термостабильных FDH из бактерий *Pseudomonas* sp. 101 (PseFDH). Следует отметить, что значения  $\Delta H^*$  и  $\Delta S^*$  у мутанта с заменами Ala267Met/Ile272Val/Phe290Asp выше, чем у формилдегидрогеназы из дрожжей *Candida boidinii* и растения *Arabidopsis thaliana*.

Из табл. 2 видно, что у SoyFDH дикого типа значение энтальпии активации ниже, чем у ее мутантов. Это означает, что при снижении температуры величина константы скорости термоинактивации у всех мутантных SoyFDH будет уменьшаться быстрее, чем у SoyFDH дикого типа, т.е. при уменьшении температуры эффект стабилизации должен увеличиваться. Используя уравнение теории активированного комплекса и значения  $\Delta H^*$  и  $\Delta S^*$ , полученные для SoyFDH дикого типа и мутантных ферментов, были рассчитаны величины констант скорости тер-

моинактивации и эффекта стабилизации в широком диапазоне температур. В табл. 3 представлены значения эффекта стабилизации мутантных SoyFDH по отношению к ферменту дикого типа. Видно, что у наиболее стабильного мутантного фермента с заменами Ala267Met/Ile272Val/Phe290Asp эффект стабилизации при повышенных температурах (46–66°C) составляет от 2330 до 51 раза. Это гораздо больше, чем у наиболее удачного точечного мутанта Phe290Asp. Таким образом, мутант Ala267Met/Ile272Val/Phe290Asp является самым термостабильным из мутантных SoyFDH, рассмотренных в данной работе, он превосходит по термостабильности формилдегидрогеназу *A. thaliana* и *C. boidinii*.

Поскольку все мутируемые остатки расположены в коферментсвязывающем домене, было интересно оценить вклад замены в 290-м положении в общий эффект стабилизации тройного мутанта. Для оценки

Таблица 3. Значения эффекта стабилизации\* мутантных SoyFDH по отношению к ферменту дикого типа при различных температурах (0.1 М натрий-фосфатный буфер pH 7.0)

T, °C	Эффект стабилизации											
	1	2	3	4	5	6	7**	8	9**	10	11**	12
	wt-SoyFDH	SoyFDH M1 (A267M) [4]	SoyFDH M1+M2 (A267M/I272V) [4]	SoyFDH M3 (F290N) [5]	SoyFDH M4 (F290D) [5]	SoyFDH M5 (F290S) [5]	Эфф. ст. (M1+M2)*Эфф. ст. M3	SoyFDH M1+M2+M3	Эфф. ст. (M1+M2)*Эфф. ст. M4	SoyFDH M1+M2+M4	Эфф. ст. (M1+M2)*Эфф. ст. M5	SoyFDH M1+M2+M5
25	1	9	130	200	11000	52	26000	9200	1430000	233200	6760	450
30	1	7	81	120	4100	33	9720	3820	332100	73540	2673	265
46	1	4.3	18	25	230	8.8	450	280	4140	2330	158	54
48	1	4	15	20	160	7.5	300	188	2400	1440	114	41
50	1	3.8	13	17	120	6.5	221	148	1560	1030	85	37
52	1	<b>3.6</b>	<b>11</b>	15	85	5.5	165	135	935	856	61	38
54	1	<b>3.4</b>	<b>8.9</b>	<b>12</b>	61	4.8	107	76	5439	436	43	24
56	1	<b>3.2</b>	<b>7.5</b>	<b>10</b>	44	4.1	75	58	330	308	30.8	21
58	1	<b>3</b>	<b>6.4</b>	<b>8.6</b>	<b>32</b>	<b>3.5</b>	55	<b>50</b>	205	218	22	19
60	1	<b>2.8</b>	<b>5.4</b>	<b>7.3</b>	<b>23</b>	<b>3.1</b>	39	<b>32</b>	124	<b>160</b>	17	14
62	1	2.7	4.6	<b>6.1</b>	<b>17</b>	<b>2.7</b>	28	<b>23</b>	78	<b>93</b>	12	11
64	1	2.5	3.9	5.2	<b>12</b>	<b>2.3</b>	20	<b>22</b>	47	<b>71</b>	9	12
66	1							15		<b>51</b>		9

\*Эффект стабилизации рассчитывали как отношение соответствующих констант скорости инактивации при одной температуре. Полужирным шрифтом выделены величины, полученные с использованием экспериментальных данных. Остальные значения рассчитаны с помощью уравнения теории активированного комплекса с использованием полученных параметров  $\Delta H^*$  и  $\Delta S^*$ .

\*\*В колонках 7, 9 и 11 указан теоретически возможный эффект стабилизации, полученный при умножении эффекта стабилизации исходного двойного мутанта на эффект стабилизации за счет замены в 290-м положении.



такого вклада используется понятие аддитивности. С этой целью сравнивают экспериментальное значение эффекта стабилизации с теоретически возможным. Если эффекты стабилизации в исходных мутантах не зависят друг от друга, то теоретический эффект стабилизации мутанта, в котором объединены рассматриваемые замены, будет равен произведению эффектов стабилизации исходных мутантов. Если теоретическое значение совпадает с экспериментальным, то говорят о 100% аддитивности. Если эта величина менее 100%, то аддитивность не полная, а если более 100% – то существует положительная кооперативность или синергичность эффекта стабилизации. В табл. 3 в колонках 7, 9 и 11 представлены значения теоретического суммарного эффекта стабилизации, рассчитанного как произведение величины эффекта стабилизации исходной мутантной SoyFDH с двойной заменой Ala267Met/Ile272Val на величину эффекта стабилизации мутанта с соответствующей заменой в 290-м положении. Из колонок 6 и 7 видно, что в случае мутантной SoyFDH Ala267Met/Ile272Val/Phe290Asn при температуре 64°C наблюдается 100% аддитивность, а при уменьшении температуры этот параметр начинает медленно снижаться. Аналогичная картина наблюдается и у мутантной SoyFDH Ala267Met/Ile272Val/Phe290Ser (табл. 3, колонки 11 и 12) при 62°C и ниже, а при температуре 64°C аддитивность стабилизации превышает 100%. Очень интересная картина наблюдается и у наиболее стабильного мутанта SoyFDH Ala267Met/Ile272Val/Phe290Asp (табл. 3, колонки 9 и 10). При всех использованных температурах аддитивность стабилизации превышает 100%, хотя при уменьшении температуры эта величина снижается, как и в двух предыдущих случаях. Высокую аддитивность эффекта стабилизации при объединении нескольких аминокислотных замен (до 100%) наблюдали и для FDH бактерий *Pseudomonas* sp. 101 [15, 16], однако сами величины стабилизирующих эффектов (в 1.1–2.5 раза) просто не сравнимы с эффектами, полученными в данной работе.

Причина увеличения теоретического эффекта стабилизации (и, как следствие, снижение эффекта аддитивности) при снижении температуры пока не ясна, однако следует обратить внимание, что константа скорости термоинактивации у разных мутантов SoyFDH по-разному зависит от температуры, и при объединении аминокислотных замен суммарное изменение структуры белка, обусловленное этими мутациями, может отличаться при разных температурах. Более точно понять причины наблюдаемого эффекта помогут дополнительные эксперименты, проведение которых в цели и задачи нашей работы не входило.

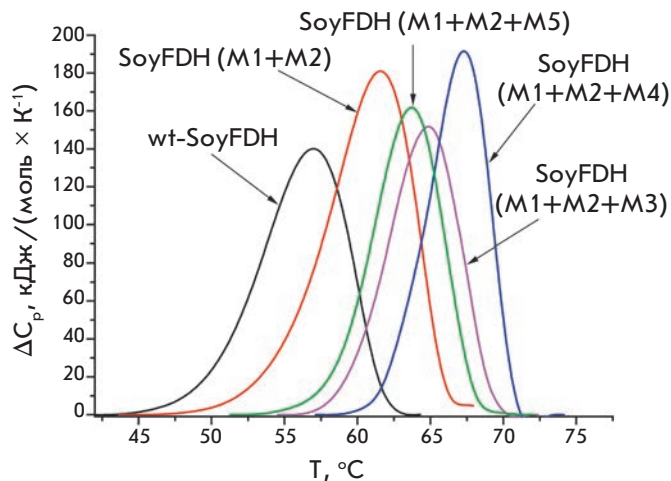


Рис. 5. Кривые плавления многоточечных мутантных SoyFDH и фермента дикого типа. 0.1 М натрий-фосфатный буфер pH 7.0. Концентрация ферментов – 2 мг/мл, скорость нагрева 1 град/мин. M1 – Ala267Met, M2 – Ile272Val, M3 – Phe290Asn, M4 – Phe290Asp, M5 – Phe290Ser

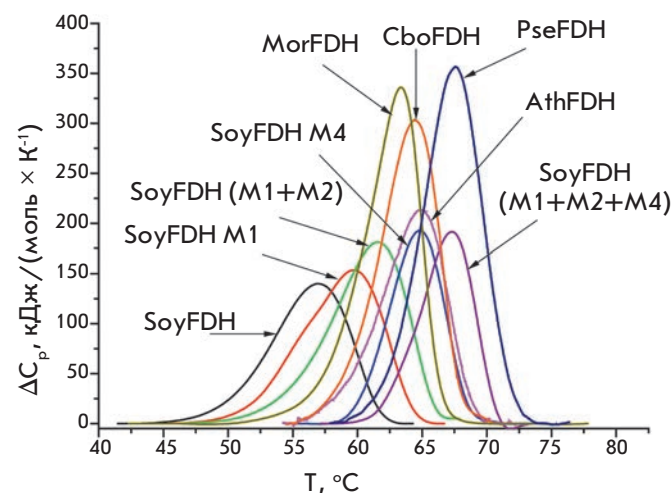


Рис. 6. Кривые плавления, полученные с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии, для формиаатдегидрогеназ дикого типа из различных источников и многоточечных мутантных SoyFDH. 0.1 М натрий-фосфатный буфер pH 7.0. Концентрация ферментов – 2 мг/мл, скорость нагрева 1 град/мин. M1 – Ala267Met, M2 – Ile272Val, M3 – Phe290Asn, M4 – Phe290Asp, M5 – Phe290Ser. PseFDH, MorFDH, CboFDH, SoyFDH и AthFDH – рекомбинантные формиаатдегидрогеназы дикого типа из бактерий *Pseudomonas* sp. 101, *Moraxella* sp. C1, дрожжей *Candida boidinii*, сои *Glycine max* и арабидопсиса *Arabidopsis thaliana* соответственно.

**Таблица 4.** Параметры фазовых переходов мутантных форм и SoyFDH дикого типа (0.1 М натрий-фосфатный буфер, pH 7.0)

Фермент	Температура фазового перехода, $T_m$ , °C	$T_m - T_m^{wt-SoyFDH}$ , °C	Показатель кооперативности, $T_{1/2}$ , °C	Ссылка
wt-PseFDH	67.6	10.6	5.4	[17]
PseFDH GAV	68.9	11.9	5.3	[17]
wt-AthFDH	64.9	7.9	5.9	[17]
wt-CboFDH	64.4	7.4	5.3	[17]
<b>wt-SoyFDH</b>	<b>57.0</b>	<b>0.0</b>	<b>7.1</b>	[5]
SoyFDH M1 (A267M)	59.7	2.7	7.5	[4]
SoyFDH M1+M2 (A267M/I272V)	61.6	4.6	6.8	[4]
SoyFDH F290D	64.8	7.8	5.0	[5]
SoyFDH F290N	61.3	4.3	6.6	[5]
SoyFDH F290S	59.9	2.9	6.4	[5]
SoyFDH M1+M2+M3 (A267M/I272V/F290N)	64.9	7.9	5.8	Данная работа
SoyFDH M1+M2+M4 (A267M/I272V/F290D)	67.3	10.3	4.8	Данная работа
SoyFDH M1+M2+M5 (A267M/I272V/F290S)	63.7	6.7	5.6	Данная работа

**Изучение температурной стабильности мутантных SoyFDH методом дифференциальной сканирующей калориметрии**

Результаты исследования многоточечных мутантных SoyFDH с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии представлены на рис. 5. Для сравнения также приведена кривая плавления двойного мутанта SoyFDH Ala267Met/Ile272Val. Из рис. 5 видно, что увеличение температуры теплового перехода тройных мутантов по сравнению с двойным имеет ту же тенденцию, что и при определении термостабильности по кинетике термоинактивации – чем выше эффект стабилизации за счет замены в 290-м положении, тем выше температура фазового перехода тройного мутанта. Как и следовало ожидать, самым стабильным оказался мутант SoyFDH Ala267Met/Ile272Val/Phe290Asp.

На рис. 6 представлены кривые плавления наиболее стабильных мутантных SoyFDH и ферментов из других источников, которые позволяют оценить величину увеличения термостабильности мутантов. Видно, что SoyFDH Ala267Met/Ile272Val/Phe290Asp стабильнее FDH из *A. thaliana*, *C. boidinii* и *Moraxella* sp. C1 и очень близка к ферменту из *Pseudomonas* sp.

101 (PseFDH), одному из наиболее стабильных среди описанных формиятдегидрогеназ [2, 15].

В табл. 4 приведены численные значения параметров фазовых переходов. Видно, что из всех многоточечных мутантов FDH сои самую высокую температуру фазового перехода имеет SoyFDH Ala267Met/Ile272Val/Phe290Asp, что хорошо согласуется с данными по кинетике термоинактивации. Сравнение этой мутантной формы с формиятдегидрогеназами из других источников показало, что этот фермент по термостабильности занимает второе место после PseFDH.

Таким образом, нами получены три мутантные формы формиятдегидрогеназы из сои, обладающие гораздо более высокой температурной стабильностью, чем фермент дикого типа, а также двойные и точечные мутанты-предшественники. Отличительной особенностью является то, что этот эффект достигнут без существенного изменения каталитических параметров по сравнению с исходной SoyFDH. ●

*Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты № 14-04-01625-а и 14-04-01665-а).*

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Тишков В.И., Попов В.О. // Биохимия. 2004. Т. 69. № 11. С. 1537–1554.
2. Tishkov V.I., Popov V.O. // Biomol. Eng. 2006. V. 23. № 1. P. 89–110.
3. Алексеева А.А., Савин С.С., Тишков В.И. // Acta Naturae. 2011. Т. 3. № 4(11). С. 40–56.
4. Алексеева А.А., Савин С.С., Клейменов С.Ю., Упоров И.В., Пометун Е.В., Тишков В.И. // Биохимия. 2012. Т. 77. № 10. С. 1443–1456

5. Alekseeva A.A., Serenko A.A., Kargov I.S., Kleimenov S.Y., Savin S.S., Tishkov V.I. // Protein Eng. Des. Sel. 2012. V. 25. № 11. P. 781–788.
6. Kargov I.S., Kleimenov S.Y., Savin S.S., Tishkov V.I., Alekseeva A.A. // Protein Eng. Des. Sel. 2015. V. 28. № 6. P. 171–178.
7. Романова Е.Г., Алексеева А.А., Пометун Е.В., Тишков В.И. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2010. Т. 51. № 3. С. 156–159.
8. Садыхов Э.Г., Серов А.Е., Ясный И.Е., Войнова Н.С., Алексеева А.А., Петров А.С., Тишков В.И. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2006. Т. 47. № 1. С. 31–34.
9. Andreadeli A., Flemetakis E., Axarli I., Dimou M., Udvardi M. K., Katinakis P., Labrou N.E. // Biochim. Biophys. Acta. 2009. V. 1794. P. 976–984.
10. Slusarczyk H., Felber S., Kula M.R., Pohl M. // Eur. J. Biochem. 2000. V. 267. P. 1280–1289.
11. Felber S. Optimierung der NAD<sup>+</sup>-abhängigen Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii* für den Einsatz in der Biokatalyse. Ph.D. Thesis. Heinrich-Heine University of Duesseldorf, 2001. URL: <http://diss.uni-duesseldorf.de/ebib/diss/file?dissid=78>.
12. Cornish-Bowden A. Fundamentals of Enzyme Kinetics. 4th Ed. Wiley-Blackwell, 2012. 510 p.
13. Тишков В.И., Уланова С.В., Федорчук В.В., Савин С.С. // Acta Naturae. 2010. Т. 2. № 2(5). С. 86–92
14. Серов А.Е., Тишков В.И. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2006. Т. 47. № 2. С. 79–82.
15. Rojkova A.M., Galkin A.G., Kulakova L.B., Serov A.E., Savitsky P.A., Fedorchuk V.V., Tishkov V.I. // FEBS Lett. 1999. V. 445. № 1. P. 183–188.
16. Серов А.Е., Одицева Е.Р., Упоров И.В., Тишков В.И. // Биохимия. 2005. Т. 70. № 7. С. 974–979.
17. Садыхов Э.Г., Серов А.Е., Войнова Н.С., Уланова С.В., Петров А.С., Алексеева А.А., Клейменов С.Ю., Попов В.О., Тишков В.И. // Прикл. биохимия и микробиол. 2006. Т. 42. № 3. С. 269–273.