

УДК 577.1; 577.15

Роль остатка Ala198 в стабильности и коферментной специфичности бактериальных формиаатдегидрогеназ

А. А. Алексеева^{1,2}, В. В. Федорчук^{2,3}, С. А. Зарубина^{2,3}, Э. Г. Садыхов¹, А. Д. Маторин³,
С. С. Савин^{1,2,3}, В. И. Тишков^{1,2,3*}

¹Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, 119071, Москва, Ленинский просп., 33, корп. 2

²ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», 109559, Москва, ул. Цимлянская, 16, оф. 96

³Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, 119992, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3

*E-mail: vitishkov@gmail.com

Поступила в редакцию 26.11.2014

РЕФЕРАТ Согласно данным рентгеноструктурного анализа, остаток Ala198, расположенный в коферментсвязывающем домене NAD⁺-зависимых формиаатдегидрогеназ [КФ 1.2.1.2] (ФДГ) из бактерий *Pseudomonas* sp. 101 и *Moraxella* sp. C-1 (PseFDH и MorFDH соответственно), имеет неоптимальные значения углов ψ и ϕ . Методом направленного мутагенеза этот остаток был заменен на остаток Gly. Мутантные PseFDH A198G и MorFDH A198G экспрессировали в клетках *Escherichia coli* и получили в высокоочищенном (> 95% чистоты) виде. Исследование кинетики термоинактивации показало, что PseFDH A198G и MorFDH A198G в 2.5 раза более стабильны, чем соответствующие ферменты дикого типа. Анализ кинетических свойств свидетельствует, что введение замены A198G в PseFDH и MorFDH приводит к уменьшению величины K_m по NAD⁺ с 60 до 35 и с 80 до 45 мкМ соответственно, в то время как величина K_m по формиаату остается неизменной. Замена A198G была введена также в мутантную PseFDH D221S, коферментная специфичность которой была изменена от NAD⁺ к NADP⁺. В этом случае также наблюдалось увеличение термостабильности, однако эффект на кинетические параметры был противоположным – константа Михаэлиса по NADP⁺ увеличилась с 190 до 280 мкМ, а по формиаату возросла с 43 до 89 мМ. Полученные данные позволяют с высокой вероятностью предположить, что ФДГ из бактерий *Pseudomonas* sp. 101 ранее была NADP⁺-, а не NAD⁺-зависимым ферментом.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА кинетические параметры, коферментная специфичность, направленный мутагенез, субстратная специфичность, термостабильность, формиаатдегидрогеназа.

ВВЕДЕНИЕ

Отличительная особенность NAD⁺-зависимых дегидрогеназ – наличие в их коферментсвязывающем домене характеристической последовательности (fingerprint) GxGxxG [1]. Фактически единственное исключение из этого правила представляют формиаатдегидрогеназы из бактерий и микроскопических грибов [КФ 1.2.1.2] (ФДГ). Практически во всех бактериальных ФДГ (кроме ферментов из симбиотических бактерий *Sinorhizobium meliloti* и из бактерий родов *Bordetella* и *Staphylococcus*) в первом положении последовательности GxGxxG вместо остатка Gly расположен остаток Ala (рис. 1). Аналогичная картина наблюдается и в ферментах из микроскопических грибов, тогда как все известные ФДГ из различных дрожжей и растений подчиняются указанному правилу и имеют классическую характеристическую последовательность.

В нашей лаборатории проводятся систематические исследования ФДГ из различных источников, в том числе из метилотрофных бактерий *Pseudomonas* sp. 101 и *Moraxella* sp. C-1 (PseFDH и MorFDH соответственно). В обоих ферментах неканонический остаток Ala находится в положении 198. В сотрудничестве с лабораторией В.О. Попова (Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН), В.С. Ламзина (EMBL Outstation, Hamburg) и группой К.М. Полякова (Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН) были определены трехмерные структуры как свободных ферментов, так и их различных комплексов [2–5]. В структурах обоих ферментов остаток Ala198 имеет «запрещенные» значения углов ψ и ϕ , что мешает оптимальной ориентации вторичных структурных элементов (рис. 2). Данные рентгеноструктурного анализа PseFDH и MorFDH свидетельствуют,

что остаток Ala198 расположен между β A-тяжом и α B-спиралью (рис. 3А).

В представленной работе для снятия конформационного напряжения в структуре и выяснения роли Ala198 в стабильности и каталитических свойствах PseFDH и MorFDH методом направленного мутагенеза этот остаток был заменен на остаток Gly. Кроме того, мутация Ala198Gly была введена в PseFDH с заменой Asp221Ser, полученную ранее в нашей лаборатории. В результате последней замены кофериентная специфичность PseFDH изменилась с NAD⁺ к NADP⁺ [6, 7], поэтому было важно определить, как снятие конформационного напряжения повлияет на стабильность и кофериентную специфичность NADP⁺-специфичной PseFDH.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Генно-инженерные эксперименты проводили с использованием реактивов 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), хлорид натрия («ч. д. а.», «Хеликон», Россия). Эндонуклеазы рестрикции, ДНК-лигазу фага T4 и Pfu-ДНК-полимеразу фирмы Thermo Scientific (США) использовали для направленного мутагенеза и клонирования фрагментов ДНК. Для очистки ДНК из агарозного геля и выделения плазмид из клеток *E. coli* использовали наборы реагентов фирмы Thermo Scientific (США). Олигонуклеотиды для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) и секвенирования были синтезированы фирмой «Синтол» (Россия). Во всех экспериментах по модификации ДНК использовали воду, очищенную на установке Milliq (Millipore, США).

Все реактивы, использованные для электрофореза белков, произведены фирмой Bio-Rad (США). Для очистки и изучения свойств фермента применяли сульфат аммония марки «х. ч.» («Диам», Россия), мочевины марки «ч. д. а.» («РеаХим», Россия), NAD⁺ и NADP⁺ с чистотой не менее 99% фирмы AppliChem (Германия), EDTA, формиат натрия и дигидрофосфат натрия pure for analysis фирмы Merck (Германия), азид натрия фирмы Serva (Германия).

Реакции направленного мутагенеза

Точечные замены вводили с помощью двустадийной ПЦР. В качестве матрицы использовали плазмиды pPseFDH8, pPseFDH8_D221S и pMorFDH2, в которых гены *psefdh* и *morfdh* находятся под контро-

лем сильного промотора РНК-полимеразы фага T7. Для введения мутаций использовали прямой (T7_For) и обратный (T7_Rev) праймеры на начало и конец гена соответственно, а также прямой и обратный праймеры, несущие требуемую замену в гене *psefdh*. Нуклеотидные последовательности праймеров приведены ниже.

T7_For	5'-ТААТАСГАСТСАСТАТАГГГ-3'
T7_Rev	5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'
PseFDH_A198G_for	5'-GTCGGCACCGTGGGCGCCGGTGCATCGGT-3'
PseFDH_A198G_rev	5'-CGACCGGCGCCCGGTCGCCGACATGCATCG-3'
MorFDH_A198G_for	5'-CACCGTGGCCGCGCCGCGCATCGGCCTG-3'
MorFDH_A198G_rev	5'-TGCGGCCGCGCGCACGGTGCATGCATG-3'.

Реакционная смесь для ПЦР содержала 2.5 мкл 10-кратного буфера для Pfu-ДНК-полимеразы (200 мМ трис-НСl (рН 8.8 при 25°C), 100 мМ (NH₄)₂SO₄, 100 мМ КСl, 1 мг/мл БСА, 1% (v/v) Тритон X-100, 20 мМ MgSO₄); 2.5 мкл смеси dNTP (dATP, dGTP, dTTP, dCTP, концентрация каждого 2.5 мМ); 1 мкл ДНК-матрицы (~10 нг/мкл); по 2 мкл праймеров (10 нмоль/мл); 0.5 мкл Pfu-ДНК-полимеразы (2.5 Ед/мкл) и деионизованную воду до общего объема смеси 25 мкл. ПЦР проводили в тонкостенной пластиковой пробирке объемом 0.5 мл (SSI, США) на приборе Терцик («ДНК-Технологии», Россия). Для предотвращения испарения реакционной смеси в пробирку также добавляли 30 мкл минерального масла. Пробирку прогревали в течение 5 мин при 95°C, а затем проводили реакцию по следующей программе: денатурация – 95°C, 30 с; связывание праймеров – 54–58°C, удлинение цепи – 72°C, 2 мин, всего 25–35 циклов. После последнего цикла реакционную смесь дополнительно выдерживали в течение 5 мин при 72°C. Температуру на второй стадии выбирали на 3–5°C ниже температуры плавления дуплексов (T_{пл}), образуемых праймерами.

При проведении первых двух ПЦР в случае PseFDH использовали праймеры T7_For/PseFDH_A198G_rev (фрагмент 1) и PseFDH_A198G_for/T7_Rev (фрагмент 2). Для MorFDH использовали пары T7_For/MorFDH_A198G_rev и MorFDH_A198G_for/T7_Rev (фрагменты 1 и 2 соответственно). Продукты ПЦР – фрагмент 1 и фрагмент 2, очищали электрофорезом в 1% агарозном геле. Затем проводили третью, объединяющую ПЦР с праймерами T7For и T7Rev, где в качестве ДНК-матрицы использовали очищенные фрагменты 1 и 2. Продукт третьей ПЦР – очищали так же, как фрагменты 1 и 2, и обрабатывали эндонуклеазами рестрикции XhoI и EcoRI. Затем ДНК очищали электрофорезом в 1% агарозном геле с последующей экстракцией из геля и лигировали с плазмидами pPseFDH8, pPseFDH8_D221S

и pMorFDH2, расщепленных теми же эндонуклеазами рестрикции. После лигирования реакционной смесью трансформировали клетки *E. coli* DH5 α , высевали их на чашки Петри с агаризованной средой, содержащей ампициллин (100 мкг/мл), и выдерживали в течение 16 ч при 37°C. Брали по три колонии каждого мутанта PseFDH A198G, PseFDH A198G/D221S и MorFDH A198G с чашки и из них выделяли плазмиды. Правильность введения мутаций контролировали с помощью секвенирования плазмидной ДНК в Центре коллективного пользования «Геном» (Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН).

Экспрессия мутантных FDH в клетках *E. coli*

PseFDH и MorFDH дикого типа и их мутантные формы экспрессировали в клетках *E. coli* BL21(DE3)/pLysS. С целью получения штамма-продуцента клетки трансформировали соответствующей плазмидой и высевали на чашки Петри с агаризованной средой, содержащей ампициллин (100 мкг/мл) и хлорамфеникол (25 мкг/мл). Для приготовления посевного материала отбирали единичную колонию, которую культивировали в течение 7–9 ч при 30°C и 180 об/мин в 5 мл среды 2YT (дрожжевой экстракт 10 г/л, бактотриптон 16 г/л, хлорид натрия 5 г/л, pH 7.0) в присутствии 100 мкг/мл ампициллина и 25 мкг/мл хлорамфеникола до достижения $A_{600} \approx 0.6–0.8$. Затем содержимое пробирок переносили в конические качалочные колбы с отбойниками объемом 1 л, содержащими 200 мл среды 2YT и 100 мкг/мл ампициллина, и клетки культивировали при 30°C и 80–90 об/мин до достижения $A_{600} \approx 0.6–0.8$. Далее клетки индуцировали, добавляя в среду культивирования раствор лактозы (300 г/л) до конечной концентрации индуктора 20 г/л. После индукции клетки культивировали в течение 17 ч при 120 об/мин. Биомассу осаждали на центрифуге Beckman J-21 (США) при 7500 об/мин в течение 20 мин при 4°C, после удаления культуральной жидкости клетки ресуспендировали в 0.1 М натрий-фосфатном буфере pH 8.0 в соотношении 1 : 4 (масс./объем). Полученную суспензию замораживали и хранили при –20°C.

Выделение и очистка

Ферменты очищали с использованием методики, разработанной для получения рекомбинантной PseFDH дикого типа [8]. Из полученной биомассы готовили 20% (w/v) суспензию клеток, содержащих PseFDH и MorFDH дикого типа и их мутанты, в 0.1 М натрий-фосфатном буфере pH 8.0. Полученные суспензии подвергали двум циклам замораживания–оттаивания, затем клетки разрушали с использованием ультра-

звукового дезинтегратора Branson Sonifier 250 (Германия) при постоянном охлаждении. Осадок удаляли центрифугированием на центрифуге Eppendorf 5804 R (11000 об/мин, 30 мин), а к супернатанту добавляли по каплям насыщенный раствор сульфата аммония до концентрации, равной 35% от насыщения. Полученный раствор инкубировали в течение нескольких часов при 4°C. Осадок отделяли с помощью центрифугирования на центрифуге Beckman J21 при 20000 об/мин (30 мин, 4°C), а супернатант использовали для гидрофобной хроматографии на Phenyl Sepharose Fast Flow (Pharmacia Biotech) в нисходящем градиенте 35–0% концентрации сульфата аммония в 0.1 М натрий-фосфатном буфере pH 7.0. Собирали активные фракции, раствор фермента концентрировали в ячейке через мембрану PM-10 (Amicon). Далее препарат фермента обессоливали на колонке с Сефадексом G-25 в том же буфере. Чистоту препаратов контролировали с помощью аналитического электрофореза в 12% полиакриламидном геле в присутствии 0.1% додецилсульфата натрия на приборе для электрофореза MiniProtean II фирмы BioRad.

Измерение активности формиатдегидрогеназы

Активность ФДГ определяли спектрофотометрически по накоплению NADH (NADPH) на длине волны 340 нм ($\epsilon_{340} = 6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) на спектрофотометре Shimadzu UV 1800 PC при 30°C в 0.1 М натрий-фосфатном буфере pH 7.0. Концентрация формиата натрия и NAD(P)⁺ в кювете составляла 0.6 М и 1 мг/мл соответственно.

Определение констант Михаэлиса

Константы Михаэлиса по NAD⁺, NADP⁺ и формиату определяли из зависимостей активности фермента от концентрации (0.4–6 K_M) соответствующего субстрата. Концентрация второго субстрата была насыщающей (> 15 K_M). Точные концентрации исходных растворов NAD⁺ и NADP⁺ определяли спектрофотометрически на длине волны 260 нм ($\epsilon_{260} = 17800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Раствор формиата натрия с заданной концентрацией готовили, растворяя нужное количество субстрата в 0.1 М натрий-фосфатном буфере pH 7.0. Объем раствора доводили в мерной колбе. Значения K_M рассчитывали из экспериментальных зависимостей методом нелинейной регрессии с помощью программы Origin Pro 8.5.

Изучение кинетики термоинактивации

Термостабильность ферментов измеряли в 0.1 М натрий-фосфатном буфере pH 7.0 при нескольких температурах. Для каждого эксперимента готовили серию пластиковых пробирок объемом 0.5 мл, содержащих

по 100 мкл раствора фермента (0.2 мг/мл) в каждой. Пробирки помещали в предварительно прогретый до необходимой температуры водный термостат (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 ФДГ измеряли как описано выше. Константу скорости термоинактивации k_m определяли как величину тангенса угла наклона прямой из графика зависимости натурального логарифма величины остаточной активности от времени (полулогарифмические координаты $\ln(A/A_0) - t$) методом линейной регрессии, используя программу Origin Pro 8.5.

Компьютерное моделирование

Структуры мутантных PseFDH и MorFDH моделировали с помощью пакета Insight II (Accelrys), используя в качестве базовой структуру холо-форм PseFDH (2NAD, разрешение 2.05 Å) и MorFDH (3FN4, разрешение 1.96 Å). Дополнительную оптимизацию полученной структуры проводили с помощью молекулярной механики (модуль Discover_3 в Insight II, силовое поле CVFF, 1000 циклов), молекулярной динамики (5 пс) и повторно молекулярной механики (1000 циклов). Структуры PseFDH и MorFDH анализировали с помощью пакета программ Accelrys Discovery Studio 2.1. Этот же пакет использовали для получения изображений белковой глобулы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор положений для направленного введения аминокислотных замен

Ферменты с заданными свойствами можно успешно получить при помощи методов белковой инженерии. Один из широко используемых подходов – рациональный дизайн. На первом этапе детально анализируют трехмерную структуру целевого фермента и осуществляют выбор положений для направленного введения аминокислотных замен. Далее проводят множественное выравнивание аминокислотных последовательностей в районе, выбранном для замены положений, чтобы определить тип вводимых остатков. Окончательный выбор типа вводимых в определенное положение остатков осуществляют после анализа модельных структур вероятных мутантов. Мы применили метод рационального дизайна для двух формиатдегидрогеназ из бактерий *Pseudomonas* sp. 101 и *Moraxella* sp. C-1.

Известно, что участок активного центра, ответственный за связывание рибозной части кофермента, обладает рядом структурных закономерностей,

характерных для NAD(P)^+ -зависимых дегидрогеназ. У большинства ферментов этой группы кофермент-связывающий домен состоит из двух субдоменов, отвечающих за связывание адениновой и никотинамидной частей кофермента. Каждый из этих субдоменов состоит из чередующихся β -тяжей и α -спиралей. Эта структура получила название «укладка Россмана» (Rossmann fold) [9]. Общее количество и чередование β -тяжей и α -спиралей может быть разным. Различные варианты укладки проанализированы в работе [10]. Консервативный мотив GxGxxG расположен в участке, соединяющем первые тяж β -листа и α -цепь укладки Россмана. Первый остаток глицина за счет высокой подвижности обеспечивает оптимальное взаимное расположение указанных вторичных структур, необходимое, в свою очередь, для правильной ориентации второго остатка глицина этого мотива. Второй остаток Gly благодаря этому оказывается в непосредственной близости от фосфатной части кофермента и участвует в ее связывании. Предполагается, что присутствие в этом положении любого остатка с более объемным боковым радикалом будет приводить к сильным стерическим затруднениям при связывании кофермента. Третий остаток важен для плотной упаковки структурных элементов αA и βB и их взаимной ориентации.

На *рис. 1* представлено выравнивание аминокислотных последовательностей формиатдегидрогеназ из различных организмов в районе начала коферментсвязывающего домена (фрагмент β - α - β). Из этого выравнивания видно, что у части формиатдегидрогеназ из бактерий и микроскопических грибов в первом положении характеристической последовательности вместо остатка Gly расположен Ala. В ФДГ из бактерий *Pseudomonas* sp. 101 и *Moraxella* sp. C-1 этот остаток Ala находится в положении 198. Согласно картам Рамачандрана в структурах апоформ PseFDH и MorFDH (2NAC и 3FN4 соответственно) значения углов ψ и ϕ остатка Ala198 далеки от оптимальных (*рис. 2А,Б*).

Как видно из *рис. 3А* в тройном комплексе PseFDH с NAD^+ и азид-ионом (структура 2NAD рассматривается как аналог переходного состояния) метильная группа остатка Ala ориентирована в сторону 3'-ОН-группы рибозы аденозина. Результаты компьютерного моделирования показывают, что замена Ala198Gly в PseFDH снимает конформационное напряжение (*рис. 3Б*). Аналогичная ситуация наблюдается и для MorFDH (структура 2GSD, на *рис. 3* не показано). Основываясь на данных компьютерного моделирования, мы решили получить мутантные PseFDH и MorFDH, в которых остаток Ala198 заменен на Gly.

Замену Ala198Gly также было решено ввести в полученную ранее мутантную PseFDH, кофер-

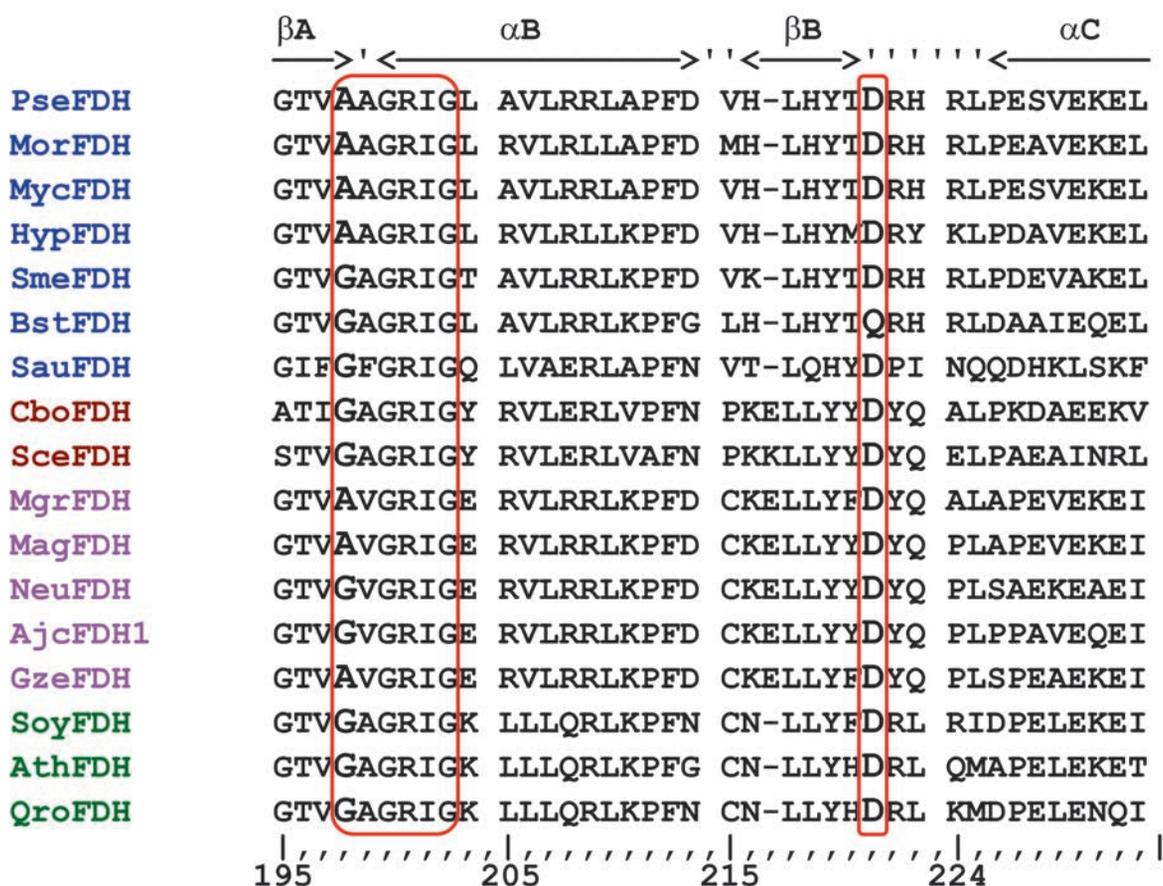


Рис. 1. Выравнивание аминокислотных последовательностей форматдегидрогеназ из различных источников в районе начала коферментсвязывающего домена. Синим цветом обозначены ФДГ из бактерий: PseFDH – *Pseudomonas* sp.101 (UniProtKB/Swiss-Prot: P33160.3), MorFDH – *Moraxella* sp. C-1 (GenBank Accession Y13245), MycFDH – *Mycobacterium vaccae* N10 (GenBank BAB69476), HypFDH – *Hyphomicrobium* штамм JC-17 (GenBank BAB55449), SmeFDH – *Sinorhizobium meliloti* 16262453 (GenBank NP_435497), BstFDH – *Burkholderia stabilis* (GenBank CP000378), SauFDH – *Staphylococcus aureus* (NCBI Reference Sequence: WP_031923037.1); коричневым – из дрожжей: CboFDH – *Candida boidinii* (GenBank Accession ABE69165), SceFDH – пекарские дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* (EMBL Z75296); маджентой – из микроскопических грибов: MgrFDH – *Mycosphaerella graminicola* (*Septoria tritici*) (UniProt Q9Y790), MagFDH – *Magnaporthe grisea* (EMBL AA415108), NeuFDH – *Neurospora crassa* (GenBank Accession XP_961202), AjcFDH – *Ajellomyces capsulatus* (GenBank Accession XP_001539240), GzeFDH – ФДГ из микроскопических грибов *Gibberella zeae* (GenBank Accession XM_386303); и зеленым цветом – из растений: SoyFDH – соя *Glycine max* (GenBank Accession GB_BT094321), AthFDH – резуховидка Таля *Arabidopsis thaliana* (EMBL AF208029), QroFDH – дуб *Quercus robur* (GenBank Accession GB_AJ577266)

ментная специфичность которой изменилась с NAD^+ к NADP^+ . Такой эффект был достигнут за счет точечной замены Asp221Ser (рис. 3B). Результаты компьютерного моделирования показали (рис. 3B), что за счет остатка Ala198 стерическое напряжение в структуре мутантного фермента в комплексе с NADP^+ не такое сильное, как у фермента дикого типа. Тем не менее в результате замены Ala198Gly должна появиться дополнительная полость, которая позволила бы более эффективно связывать 3'-фосфатную группу кофермента (рис. 3Г).

Получение мутантных ферментов

После проведения мутагенеза с помощью полимеразной цепной реакции для каждого из трех мутантов – PseFDH Ala198Gly, PseFDH Ala198Gly/Asp221Ser и MorFDH Ala198Gly, было выделено по три плазмиды. Результаты секвенирования показали, что все плазмиды содержали только требуемые мутации в генах *psefdh* и *morfdh*, а другие нуклеотидные замены отсутствовали. Для получения мутантных вариантов ферменты экспрессировали в клетках *E. coli* BL21(DE3)/pLysS. Обе мутантные PseFDH, а также

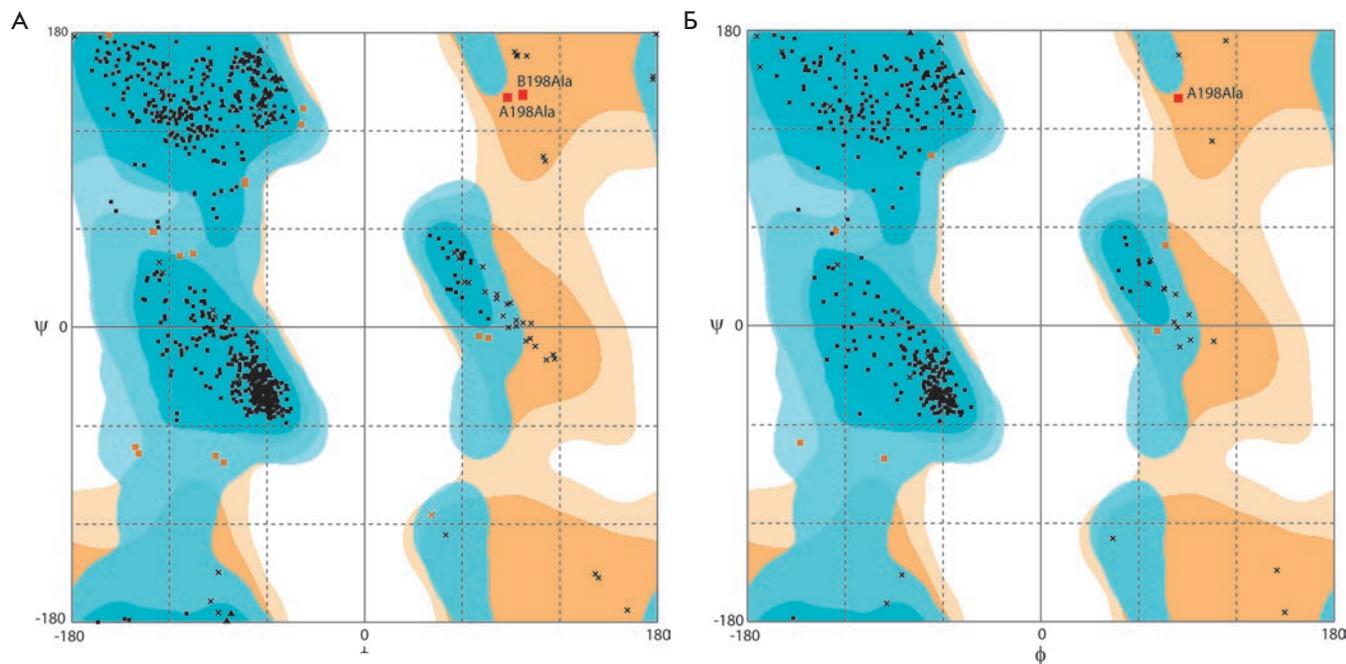


Рис. 2. Карта Рамачандрана для структур апо-форм форматдегидрогеназ из бактерий *Pseudomonas* sp. 101 (А) (PDB2NAC) и *Moraxella* sp. C-1 (Б) (PDB3FN4). Для MorFDH указана только одна пара углов ψ и ϕ , так как в кристаллографическую ячейку входит всего одна субъединица

Таблица 1. Константы скорости термоинактивации и активационные параметры мутантных PseFDH и фермента дикого типа

Мутант/ T , °C	k_{in} , $10^{-5} \cdot c^{-1}$				ΔH^\ddagger , кДж/моль	ΔS^\ddagger , Дж/(моль·К)
	60.1	62.0	63.0	65.0		
wt-PseFDH	5.4 ± 0.2	22 ± 2	32 ± 2	140 ± 12	570 ± 20	1390 ± 70
PseFDH A198G	2.7 ± 0.1	9.3 ± 0.5	13 ± 0.8	60 ± 5	580 ± 30	1410 ± 80
PseFDH D221S	9.2 ± 0.5	32 ± 4	69 ± 7	188 ± 15	570 ± 40	1410 ± 100
PseFDH D221S/ A198G	2.7 ± 0.1	8.9 ± 0.4	20 ± 3	52 ± 6	580 ± 30	1380 ± 110

мутантная MorFDH экспрессировались в активной и растворимой форме. Они были выделены по методике, представленной в разделе «Экспериментальная часть». Чистота мутантных ферментов согласно данным аналитического электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия составляла не менее 95%.

Изучение температурной стабильности мутантных форматдегидрогеназ

Термостабильность полученных мутантных PseFDH и MorFDH определяли по кинетике инактивации при нескольких температурах. У PseFDH дикого типа и ее мутантов диапазон температур, в котором проводили измерения, составил 60–65°C (табл. 1).

Во всем диапазоне инактивация проходила в соответствии с реакцией первого порядка (рис. 4). Из величин тангенсов углов наклона этих прямых были рассчитаны константы скорости термоинактивации. Величина константы скорости инактивации не зависела от концентрации фермента во всем диапазоне температур, что свидетельствовало об истинном мономолекулярном механизме процесса. Численные значения констант скорости термоинактивации приведены в табл. 1. Из табл. 1 видно, что у мутантной PseFDH с заменой Ala198Gly стабильность при всех температурах примерно в 2–2.5 раза выше, чем у фермента дикого типа. Аналогичный по величине эффект увеличения термостабильности наблюдался и в паре нативная и мутантная MorFDH A198G, одна-

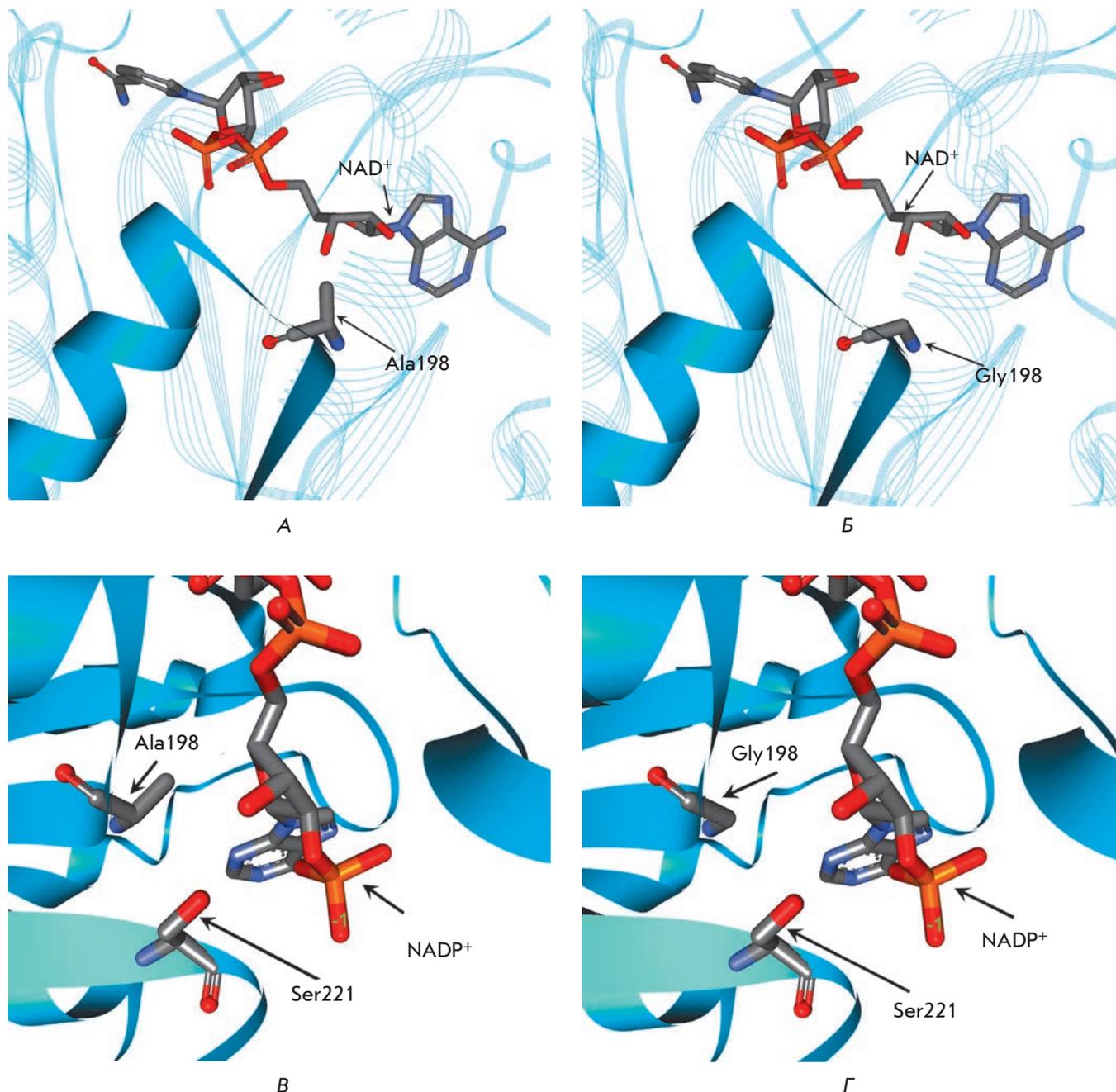


Рис. 3. Фрагменты структур форматдегидрогеназы из бактерий *Pseudomonas* sp. 101. А – фермент дикого типа в комплексе с NAD⁺ и азид-ионом (2NAD), Б – модельная структура мутантной PseFDH A198G с NAD⁺; В и Г – модельные структуры мутантных PseFDH D221S и PseFDH A198G/D221S в комплексе с NADP⁺ соответственно

ко в силу того, что MorFDH в 25 раз менее стабильна, чем PseFDH [11], кинетику инактивации изучали при более низких температурах (56–62°C).

Мутантная NADP⁺-специфичная PseFDH Asp221Ser менее стабильна, чем исходная NAD⁺-зависимая PseFDH (рис. 4 и табл. 1). Замена Ala198Gly в PseFDH Asp221Ser приводит к суще-

ственному повышению термостабильности, причем эффект стабилизации даже немного выше, чем введение аналогичной замены в фермент дикого типа (табл. 1). Полученные данные указывают на то, что метильная группа остатка Ala198 является важным дестабилизирующим фактором в этой области белковой глобулы. Аналогичный стабилизирующий

Таблица 2. Кинетические параметры природных и мутантных форматдегидрогеназ

Фермент*	$K_m^{NAD^+}$, мкМ	$K_m^{NADP^+}$, мкМ	$K_m^{HCOO^-}$, мМ	k_{cat} , с ⁻¹	$k_{cat}/K_m^{NAD^+}$, мМ ⁻¹ с ⁻¹	k_{cat}/K_m , мМ ⁻¹ с ⁻¹ мут/wt	Ссылка
Реакция с NAD ⁺							
wt-PseFDH	60 ± 5		6.5 ± 0.2	7.3 ± 0.2	122	1	[14]
PseFDH A198G	35 ± 2		7.5 ± 0.2	7.3 ± 0.1	209	1.713	Настоящая работа
PseFDH D221S	710 ± 45		32 ± 2	5.0 ± 0.3	7.04	0.058	Настоящая работа
PseFDH D221S/ A198G	540 ± 42		53 ± 1	5.0 ± 0.2	9.26	0.076	Настоящая работа
MorFDH	80 ± 7		7.7 ± 0.3	7.3 ± 0.1	91.3	1	[14]
MorFDH A198G	45 ± 3		8.0 ± 0.5	7.3 ± 0.3	162	1.774	Настоящая работа
BstFDH	1430		≥150	1.7 ± 0.1	1.19	–	[15]
wt-CmeFDH	55		НД	1.4	25.5	–	[16]
CmeFDH D195S	4700		7.0	1.6	0.34	–	[16]
wt-CboFDH	15		5.9	3.7	246.7	–	[17]
CboFDH D195S	1500		НД	0.34	0.227	9.2 × 10 ⁻⁴	[17]
CboFDH D195N	5010		НД	0.21	0.04	1.7 × 10 ⁻⁴	[17]
CboFDH D195A	4800		НД	0.76	0.158	6.4 × 10 ⁻⁴	[17]
CboFDH D195Q	960		НД	0.26	0.271	0.001	[17]
SceFDH	36		5.5	6.5	181	–	[18]
SceFDH D196A/Y197R	7600		1000	0.095	0.0125	–	[18]
Реакция с NADP ⁺							
wt-PseFDH		100000*	НД	1.3 ± 0.1	0.013	1	Настоящая работа
PseFDH D221S		190 ± 30	43	1.7 ± 0.2	3.04	234	[7]
PseFDH D221S/ A198G		280 ± 25	89	1.8 ± 0.2	6.43	495	Настоящая работа
wt-BstFDH		160	55.5	4.75	29.7	–	[15]
CmeFDH D195S		> 0.4М	НД	НД	НД	–	[16]
wt-CboFDH		>38000	НД	4 × 10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	–	[17]
CboFDH D195S		6200	НД	0.34	0.055	55000	[17]
CboFDH D195N		13200	НД	0.26	0.0196	19600	[17]
CboFDH D195A		3300	НД	0.052	0.0157	15700	[17]
CboFDH D195Q		4500	НД	0.26	0.058	58000	[17]
SceFDH D196A/Y197R		4500	1000	0.13	0.03	–	[18]

*PseFDH, MorFDH, BstFDH, CmeFDH, CboFDH, SceFDH – форматдегидрогеназы из бактерий *Pseudomonas* sp. 101, *Moraxella* sp. C-1, *Burkholderia stabilis* 15516, метилотрофных дрожжей *Candida methylca* и *C. boidinii* и пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* соответственно.

эффект – уменьшение константы скорости инактивации в 2.5 раза – наблюдался и при введении замены Ala198Gly в MorFDH (на рисунке не показано).

Интересно было выяснить, какой из двух факторов – изменение энтальпии или энтропии, приводят к повышению стабильности полученных мутантов. С этой целью были проанализированы зависимости констант скорости инактивации от температуры. На рис. 5 представлены зависимости величины наблюдаемых констант скорости инактивации первого порядка k_{in} в координатах $\ln(k_{in}/T)$ от $1/T$, где T – температура в градусах Кельвина.

Линейная зависимость вторичных графиков свидетельствует, что процесс термоинактивации нативной и мутантных ФДГ описывается уравнением

зависимости константы скорости от температуры из теории активированного комплекса [12]. Это уравнение может быть представлено в линейном виде:

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

где k_B и h – это константы Больцмана и Планка соответственно, R – универсальная газовая постоянная, а ΔH^\ddagger и ΔS^\ddagger – активационные параметры.

Параллельный ход прямых на рис. 5 свидетельствует о том, что процесс термоинактивации PseFDH дикого типа и ее мутантов характеризуется примерно одинаковыми величинами ΔH^\ddagger , а основной вклад

в увеличение стабильности ФДГ при введении мутации A198G обусловлен энтропийным фактором. Численные значения активационных параметров ΔH^\ddagger и ΔS^\ddagger процесса термоинактивации представлены в *табл. 1*.

В заключение этого раздела отметим, что увеличение стабильности фермента в 2.5 раза за счет точечной замены является большим по величине эффектом. Ранее мы провели эксперименты по направленному мутагенезу других аминокислотных остатков в глобуле PseFDH с неоптимальными значениями углов ψ и ϕ , однако не достигли увеличения стабильности, так как эти остатки участвовали в образовании водородных связей, энергия которых превосходила энергию дестабилизации за счет неоптимальной конформации [13].

Кинетические свойства мутантных ферментов

Кинетические параметры полученных мутантов приведены в *табл. 2*. Для сравнения в этой же таблице приведены аналогичные параметры для других известных ФДГ. Как уже отмечалось выше, результаты компьютерного моделирования показали, что введение замены Ala198Gly обеспечивает большую подвижность α -спирали коферментсвязывающего домена. Как следует из *табл. 2* введение данной замены в NAD^+ -специфичные PseFDH и MorFDH дикого типа улучшает связывание кофермента – в обоих случаях константа Михаэлиса по NAD^+ уменьшилась почти в 2 раза, при этом константа Михаэлиса по формату практически не меняется. Отметим, что в общем случае константа Михаэлиса не является равновесной константой, однако катализируемая PseFDH и MorFDH реакция протекает по неупорядоченному квазиравновесному кинетическому механизму [11, 19, 20]. И в этом случае величина K_m как по NAD^+ , так и по формату является равновесной константой их связывания с соответствующим двойным комплексом.

Замена Asp221Ser приводила к ухудшению сродства фермента к NAD^+ и увеличению сродства к NADP^+ (*табл. 2*). Это легко объяснить, приняв во внимание тот факт, что такая замена убирает карбоксильную группу, которая обеспечивает специфичность к NAD^+ за счет водородных связей с 2'- и 3'-ОН-группами рибозы аденозина, и отталкивает отрицательно заряженную 2'-фосфатную группу NADP^+ .

Введение второй замены Ala198Gly в мутантную NADP^+ -специфичную PseFDH Asp221Ser приводило, как и в случае фермента дикого типа, к улучшению сродства фермента к NAD^+ примерно в 1.5 раза, однако в случае NADP^+ сродство к коферменту наоборот ухудшалось примерно во столько же раз (*табл. 2*).

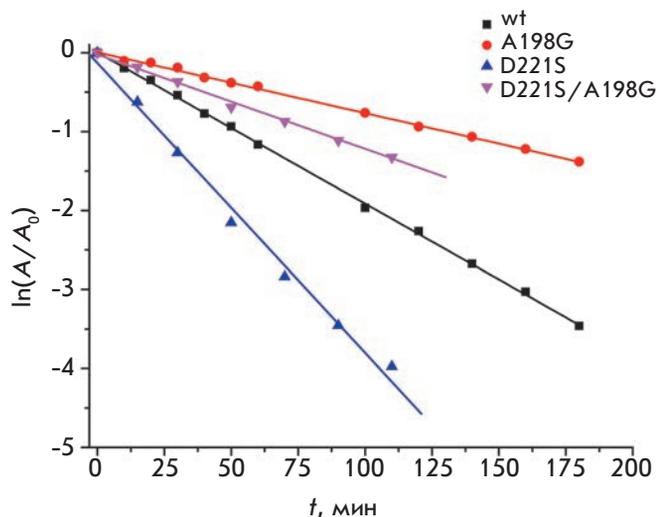


Рис. 4. Зависимость остаточной активности от времени для мутантных PseFDH Ala198Gly, PseFDH Ala198Gly/Asp221Ser и фермента дикого типа. 0.1 М фосфатный буфер pH 7.0, 63°C

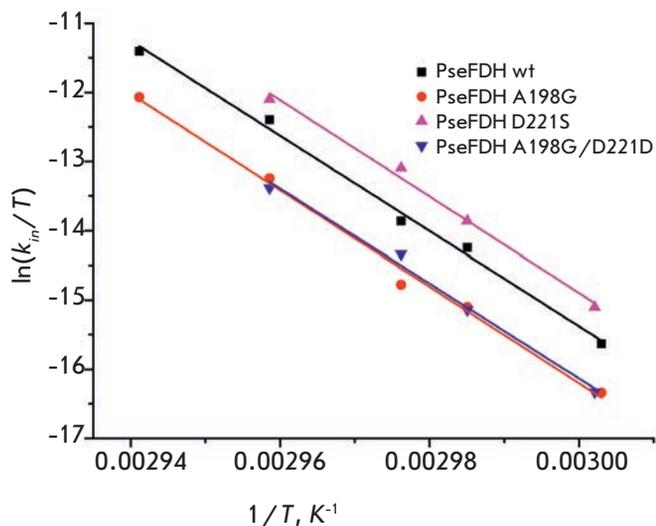


Рис. 5. Зависимость константы скорости термоинактивации от температуры в координатах $\ln(k_{in}/T) - 1/T$ для мутантов PseFDH и фермента дикого типа

Кроме того, замена Ala198Gly в вышеуказанном мутанте вызывала существенное ухудшение сродства и к формату. Это, по-видимому, связано с тем, что основные структурные изменения белковой глобулы ФДГ, необходимые для образования тройного фермент-субстратного комплекса и переходного состояния ферментативной реакции, происходят на стадии связывании кофермента. Поэтому именно конформация двойного комплекса (ФДГ-кофермент) является определяющей для эффективного связыва-

ния формиата. Известно, что даже очень небольшие изменения в активном центре ФДГ приводят к довольно заметным изменениям в средстве к формиату. В табл. 2 для сравнения представлены данные для ФДГ из бактерий *Burkholderia stabilis*. Видно, что замена в положении 221 PseFDH позволяет приблизиться к значениям констант для этого природного NADP⁺-зависимого фермента.

Полученные нами данные позволяют выдвинуть гипотезу, объясняющую наличие «неканонического» остатка Ala в первом положении высококонсервативной «канонической» последовательности GxGxxG для коферментсвязывающего домена PseFDH. По всей видимости, этот фермент представляет собой промежуточный продукт эволюции формиатдегидрогеназы от NADP⁺- к NAD⁺-специфичной. На ранних стадиях развития живых систем, когда основными метаболическими путями были аэробные процессы, ФДГ, возможно, была NADP⁺-зависимым ферментом и обеспечивала получение NADPH для биосинтеза различных соединений. Наличие остатка Ala в положении 198 NADP⁺-зависимого фермента обеспечивало в 10 раз более эффективное связывание формиата, чем в случае Gly198. У этого фермента в положении 221 находился незаряженный аминокислотный остаток, а в положении 222 – положительно заряженный остаток Arg, необходимый для нейтрализации отрицательного заряда фосфатной группы NADP⁺. В процессе эволюции при появлении метилотрофных микроорганизмов потребо-

вался фермент, эффективно использующий NAD⁺, а не NADP⁺. Первым этапом эволюционного процесса было появление остатка Asp в положении 221, обеспечивавшего NAD⁺-специфичность. ФДГ бактерий *Pseudomonas* sp. 101, по-видимому, и является продуктом этого этапа эволюции. Этот фермент уже имеет остаток Asp, ответственный за специфичность к NAD⁺, но при этом в качестве «рудиментов» содержит положительно заряженный остаток Arg222, участвующий в связывании NADP⁺, а также Ala в положении 198. ФДГ метилотрофных дрожжей появились на более поздних этапах эволюции. Эти ферменты потеряли указанные «рудиментарные» остатки, они обладают абсолютной специфичностью к NAD⁺ (табл. 2). В ходе эволюции в дрожжевых формиатдегидрогеназах также произошла замена «неканонического» остатка Ala в положении 198 на «канонический» Gly, а остаток, соответствующий по положению Arg222 в PseFDH, – на остаток Tyr, что наглядно показано в наших экспериментах по изменению коферментной специфичности от NAD⁺ к NADP⁺ у ФДГ из пекарских дрожжей [18]. Более подробно эксперименты по изменению коферментной специфичности PseFDH описаны в работе [7]. ●

Работа поддержана грантом Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук (МК-2304.2014.4).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wierenga R.W., Hol W.G.J. // *Nature*. 1983. V. 302. № 5911. P. 842–844.
2. Lamzin V.S., Dauter Z., Popov V.O., Harutyunyan E.H., Wilson K.S. // *J. Mol. Biol.* 1994. V. 236. № 3. P. 759–785.
3. Филиппова Е.В., Поляков К.М., Тихонова Т.В., Стеханова Т.Н., Бойко К.М., Садыхов Э.Г., Тишков В.И., Попов В.О. // *Кристаллография*. 2006. Т. 51. № 4. С. 663–667. (Filippova E.V., Polyakov K.M., Tikhonova T.V., Stekhanova T.N., Boiko K.M., Sadykhov E.G., Tishkov V.I., Popov, V.O., Labrou, N. // *Crystallography Reports*. 2006. V. 51. № 4. P. 627–631.)
4. Shabalin I.G., Filippova E.V., Polyakov K.M., Sadykhov E.G., Safonova T.N., Tikhonova T.V., Tishkov V.I., Popov V.O. // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 2009. V. 65. № 12. P. 1315–1325.
5. Shabalin I.G., Polyakov K.M., Tishkov V.I., Popov V.O. // *Acta Naturae*. 2009. V. 1. № 3. P. 89–93.
6. Маторин А.Д. Механизм субстратной и коферментативной специфичности бактериальной формиатдегидрогеназы: Дис. ... канд. хим. наук. М: МГУ им. М.В. Ломоносова, 2000. 127 с.
7. Alekseeva A.A., Dolina I.A., Zarubina S.A., Matorin A.D., Sadykhov E.G., Savin S.S., Tishkov V.I. // *Biochimie*. 2015. submitted for publication.
8. 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.
9. Rao S.T., Rossmann M.G. // *J. Mol. Biol.* 1973. V. 76. № 2. P. 241–256.
10. Lesk A.M. // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1995. V. 5. № 6. P. 775–783.
11. Tishkov V.I., Popov V.O. // *Biomol. Eng.* 2006. V. 23. № 1. P. 89–110.
12. Cornish-Bowden A. *Fundamentals of Enzyme Kinetics*. 4th Ed. Wiley-Blackwell, 2012. 510 p.
13. Серов А.Е., Одинцева Е.Р., Упоров И.В., Тишков В.И. // *Биохимия*. 2005. Т. 70. № 7. С. 974–979 (Serov A.E., Odintzeva E.R., Uporov I.V., Tishkov V.I. // *Biochemistry (Moscow)*. 2005. V. 70. № 4. P. 804–808.)
14. Тишков В.И., Попов В.О. // *Биохимия*. 2004. Т. 69. № 11. С. 1537–1554. (Tishkov V.I., Popov V.O. // *Biochemistry (Moscow)*. 2004. V. 69. № 11. P. 1252–1267.)
15. Hatrongjit R., Packdibamrung K. // *Enz. Microbial Technol.* 2010. V. 46. № 7. P. 557–561.
16. Gul-Karaguler N., Sessions R.B., Clarke A.R., Holbrook J.J. // *Biotechnol. Lett.* 2001. V. 23. № 4. P. 283–287.
17. Andreadeli A., Platis D., Tishkov V., Popov V., Labrou N.E. // *FEBS J.* 2008. V. 275. № 15. P. 3859–3869.
18. Serov A.E., Popova A.S., Fedorchuk V.V., Tishkov V.I. // *Biochem. J.* 2002. V. 367. № 3. P. 841–847.
19. Tishkov V.I., Galkin A.G., Egorov A.M. // *Biochimie*. 1989. V. 71. № 4. P. 551–557.
20. Серов А.Е., Попова А.С., Тишков В.И. // *ДАН*. 2002. Т. 382. № 3. С. 401–405. (Serov A.E., Popova A.S., Tishkov V.I. // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2002. V. 382. № 1–3. P. 26–30.)