

УДК 577.322.24

# Влияние дополнительных аминокислотных замен на свойства многоточечной мутантной бактериальной формиатдегидрогеназы PseFDH SM4S

А. А. Пометун<sup>1,2,3</sup>, П. Д. Паршин<sup>2,3</sup>, Н. П. Галаничева<sup>2</sup>, Л. А. Шапошников<sup>2</sup>,  
Д. Л. Атрошенко<sup>1,2,3</sup>, Е. В. Пометун<sup>4</sup>, В. В. Бурмакин<sup>2</sup>, С. Ю. Клейменов<sup>1,5</sup>, С. С. Савин<sup>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, Москва, 119071 Россия

<sup>2</sup>Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, 119991 Россия

<sup>3</sup>ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», Москва, 109559 Россия

<sup>4</sup>Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), Москва, 119991 Россия

<sup>5</sup>Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, 119334 Россия

\*E-mail: vitishkov@gmail.com

Поступила в редакцию 17.12.2021

Принята к печати 11.02.2022

DOI: 10.32607/actanaturae.11665

**РЕФЕРАТ** Формиатдегидрогеназа из бактерий *Pseudomonas* sp. 101 (PseFDH, КФ 1.2.1.2) является модельным объектом для изучения закономерностей механизма действия ферментов суперсемейства D-специфичных дегидрогеназ 2-оксикислот. Этот фермент активно используется для регенерации восстановленной формы NAD(P)H в процессах хирального синтеза с помощью оксидоредуктаз. Ранее в нашей лаборатории был получен многоточечный мутант PseFDH SM4S, обладающий повышенной температурной и химической стабильностью. С целью улучшения свойств этого мутанта в его последовательность были введены дополнительные точечные замены, что позволило получить пять новых мутантных PseFDH. Все эти ферменты выделены в высокоочищенном виде, изучены их кинетические свойства и температурная стабильность, охарактеризованная по кинетике термоинактивации и с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии. Показано, что введение в PseFDH SM4S замены E170D приводит (при сохранении кинетических свойств) к увеличению температурной стабильности в 1.76 и 10 раз по сравнению с исходным мутантом и ферментом дикого типа соответственно.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** формиатдегидрогеназа, *Pseudomonas* sp. 101, каталитические свойства, температурная стабильность, сайт-направленный мутагенез.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** FDH – формиатдегидрогеназа; NAD(P)<sup>+</sup> – никотинамидадениндинуклеотид(фосфат).

## ВВЕДЕНИЕ

NAD<sup>+</sup>-зависимая формиатдегидрогеназа (FDH, КФ 1.2.1.2) из мезофильных бактерий *Pseudomonas* sp. 101 (PseFDH) является одним из наиболее изученных ферментов этой группы. PseFDH была одной из первых формиатдегидрогеназ, которая была получена в высокоочищенном виде и охарактеризована [1]. Ген *psefdh*, кодирующий этот фермент, был первым геном формиатдегидрогеназ бактерий, который клонировали и сверхэкспрессировали в клетках

*Escherichia coli* [2, 3]. Определены кристаллические структуры апо- и холо-форм PseFDH (структуры PDB2NAC, PDB2NAD, PDB2GO1 и PDB2GUG). За последние десятилетия клонировано, выделено и охарактеризовано много новых формиатдегидрогеназ, однако PseFDH остается самой термостабильной из них [4], характеризуется высокой каталитической активностью и эффективностью [5, 6]. Недавно нами была выделена и закристаллизована формиатдегидрогеназа из патогенных бактерий *Staphylococcus*

*aureus* (SauFDH) [7], сравнивая с PseFDH по термостабильности [4] и имеющая более высокую каталитическую активность (но не эффективность) [6].

В нашей лаборатории проводятся систематические исследования взаимосвязи структура–функция в формиатдегидрогеназах. Проведены эксперименты, подтверждающие важную роль пары остатков His332-Gln313 и остатка Arg284 в каталитическом механизме PseFDH [8, 9]. С использованием гидрофобизации альфа-спиралей получены мутантные формы с точечными заменами, повышающими термостабильность фермента [10], начаты эксперименты по изменению коферментной специфичности [11], получены мутантные формы с измененной изоэлектрической точкой [12]. Методом направленного мутагенеза исследовано влияние His-tag на N-конце аминокислотной последовательности на свойства фермента дикого типа и его NADP<sup>+</sup>-специфичных мутантов [13]. Проведены эксперименты по увеличению химической стабильности PseFDH, получены мутантные формы, обладающие высокой устойчивостью в присутствии пероксида водорода [14, 15].

Как следует из вышесказанного, для получения новых биокатализаторов с улучшенными даже по одному параметру свойствами необходимо объединение нескольких аминокислотных замен, обеспечивающих требуемый положительный эффект. В ряде случаев такое объединение приводит к синергическому эффекту, например, такой эффект наблюдали при комбинации аминокислотных замен, направленных на повышение термостабильности FDH из сои [16]. В случае мутантной PseFDH SM4S за счет аминокислотных замен в 311 положении были получены ферменты, у которых температурная стабильность повысилась до 2.4 раза по сравнению с исходным и более чем в 7 раз по сравнению с PseFDH дикого типа [17].

Ранее объединение замен, повышающих каталитическую активность, а также температурную и операционную стабильность, позволило нам получить вариант PseFDH SM4S. В данной работе продолжены эксперименты, направленные на дальнейшее улучшение свойств этого мутанта. С этой целью в него были введены дополнительные точечные аминокислотные замены, которые оказывали положительный эффект на свойства фермента дикого типа.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Реакции направленного мутагенеза

Точечные замены аминокислот вводили с помощью двустадийной полимеразной цепной реакции (ПЦР). В качестве матрицы использовали плазмиду pPseFDH8\_SM4S, в которой ген *psefdh* находится под контролем 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 *psefdhsm4*:

```
T7_for      5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'
T7_rev     5'-GCT AGT TAT TGC TCA GCG G-3'
K61R_for   5'-GGC CTG CGC CGT TAT CTC GAA TCC AAC GGC CAC ACC CTG-3'
K61R_rev   5'-GAT TCG AGA TAA CGG CGC AGG CCG AGC TCG CCG G-3'
K61P_for   5'-GGC CTG CGC CGT TAT CTC GAA TCC AAC GGC CAC ACC CTG-3'
K61P_rev   5'-GAT TCG AGA TAC GGG CGC AGG CCG AGC TCG CCG G-3'
S131A_for  5'-GTC GAT CTT CAG GCG GCT ATC GAC CGT AAC GTC ACC-3'
S131A_rev  5'-GAT AGC CGC CTG AAG ATC GAC GTG GTC-3'
S160A_for  5'-GAT GAT CCT GGC GCT GGT GCG CAA CTA TCT GCC CTC-3'
S160A_rev  5'-GCA CCA GCG CCA GGA TCA TCA TCA CCA CAT G-3'
E170D_for  5'-CCT CGC ACG ATT GGG CGC GGA AGG GCG GCT G-3'
E170D_rev  5'-CTT CCG CGC CCA ATC GTG CGA GGG CAG ATA GTT GCG CAC-3'
```

Реакционная смесь для проведения ПЦР содержала 2.5 мкл 10-кратного буфера для Pfu ДНК-полимеразы (200 мМ Трис-НСl (рН 8.8 при 25°C), 100 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 100 мМ КСl, 1 мг/мл БСА, 1% (v/v) Тритон X-100, 20 мМ MgSO<sub>4</sub>); 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 добавляли 30 мкл минерального масла. Пробирку прогревали в течение 5 мин при 95°C и затем проводили реакцию по следующей программе: денатурация – 95°C, 30 с; связывание праймеров – 54–58°C, 30 с; 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<sub>m</sub>), образуемых праймерами.

Для получения фрагментов, содержащих требуемую замену, проводили две ПЦР с использованием пар праймеров: 1) прямого PseFor, содержащего необходимую нуклеотидную(ые) замену(ы), и обратного стандартного праймера T7\_rev (фрагмент 1) и 2); стандартного прямого праймера T7\_for и обратного праймера PseRev, также содержащего необходимую нуклеотидную(ые) замену(ы) (фрагмент 2). Продукты двух ПЦР очищали с помощью электрофореза в 1% агарозном геле с последующим выделением фрагментов ДНК из геля. На следующем этапе проводили третью, объединяющую, ПЦР с праймерами T7\_for и T7\_rev, где в качестве ДНК-матрицы использовали оба полученных ранее фрагмента. Продукт объединяющей ПЦР очищали таким же образом, а затем обрабатывали эндону-

клеазами рестрикции NdeI и XhoI. Этими же рестриктазами обрабатывали плазмиду PseFDH\_SM4S для удаления из нее фрагмента гена, в который вводили мутацию. Обработанный рестриктазами продукт ПЦР и плазмиду очищали с помощью электрофореза и проводили лигирование. Полученной после реакции лигирования смесью трансформировали клетки *E. coli* DH5 $\alpha$ . Введение требуемых мутаций контролировали с помощью секвенирования плазмидной ДНК в Центре коллективного пользования «Геном» (Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН) или в Центре коллективного пользования ФИЦ Биотехнологии РАН.

### Экспрессия новых мутантных PseFDH в клетках *E. coli*

PseFDH дикого типа и мутантные варианты экспрессировали в клетках *E. coli* BL21(DE3)/pLysS. Для 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 с чашки отбирали единичную колонию и культивировали в 5 мл среды 2YT (дрожжевой экстракт 10 г/л, бактотриптон 16 г/л, хлорид натрия 5 г/л, pH 7.0) в присутствии 150 мкг/мл ампициллина и 25 мкг/мл хлорамфеникола в течение 7–9 ч при 30°C и 180 об/мин до достижения величины поглощения на длине волны 600 нм  $A_{600} \approx 0.6–0.8$ . Затем 2 мл ночной культуры переносили в конические качалочные колбы с отбойниками объемом 100 мл, содержащими 20 мл среды 2YT и 150 мкг/мл ампициллина, клетки культивировали при 37°C и 120 об/мин до достижения величины поглощения  $A_{600} = 0.6–0.8$ . Клетки пересеивали в конические колбы с отбойниками, содержащими 230 мл среды 2YT без антибиотиков, культивировали при 30°C до достижения величины поглощения  $A_{600} \approx 0.6–0.8$ . Далее клетки индуцировали, добавляя в среду для 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 и 30°C. Полученную 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.). Полученную суспензию замораживали и хранили при -20°C.

### Выделение и очистка

Клетки после культивирования разрушали на ультразвуковом дезинтеграторе. Клеточный дебрис

осаждали центрифугированием (Eppendorf 5804 R, 40 мин, +4°C, 12000 об/мин), а к полученному бесклеточному экстракту добавляли насыщенный раствор сульфата аммония (конечная концентрация 35% от насыщения) в 0.1 М натрий-фосфатном буфере, 0.01 М EDTA, pH 7.0 (раствор А) и оставляли на 4–8 ч при +4°C. Нерастворившиеся белки осаждали на центрифуге Eppendorf 5804 R в стаканах объемом 50 мл (11000 об/мин, +4°C), а полученный супернатант наносили на колонку 1.0  $\times$  10 см с высокозамещенной Phenyl Sepharose FastFlow (Pharmacia Biotech, Австрия), уравновешенной раствором А. После нанесения фермента колонку промывали раствором А до исчезновения поглощения на 280 нм. Фермент элюировали с колонки нисходящим линейным градиентом сульфата аммония (35–0% от насыщения, 0.1 М фосфатный буфер, 0.01 М EDTA, pH 7.0, общий объем 150 мл). Во время проведения хроматографии собирали фракции по 5 мл, измеряли поглощение на 280 и 260 нм ( $A_{280}$  и  $A_{260}$ ) и ферментативную активность (А), отбирали фракции с максимальным соотношением ( $A/A_{280}$ ). Обессоливание проводили на колонке 2.5  $\times$  10 см (объем 25 мл) с Sephadex G25 Fine (Pharmacia Fine Chemicals, Швеция), уравновешенной буфером 0.1 М Na-фосфат, 0.01 М EDTA, pH 7.0. Собирали фракции по 0.5 мл, в каждой фракции определяли ферментативную активность и поглощение на 280 нм. 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 согласно протоколу производителя. Концентрацию фермента в пробах рассчитывали из величины поглощения 1.6 для 0.1% раствора очищенной PseFDH на длине волны 280 нм.

### Измерение активности формиадегидрогеназы

Активность FDH определяли спектрофотометрически по накоплению NADH на длине волны 340 нм ( $\epsilon_{340} = 6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) на спектрофотометре Shimadzu UV1800 PC при 30°C в 0.1 М натрий-фосфатном буфере, pH 7.0. Концентрация формиата натрия и NAD<sup>+</sup> в кювете составляла 0.6 М и 1 мг/мл соответственно.

### Определение константы Михаэлиса

Константы Михаэлиса по NAD<sup>+</sup> и формиату определяли из зависимостей активности фермента от концентрации (0.4–6  $K_M$ ) соответствующего субстрата. Концентрация второго субстрата была насыщающей (>15  $K_M$ ). Точную концентрацию исходного раствора NAD<sup>+</sup> определяли спектрофотометрически на длине волны 260 нм ( $\epsilon_{260} = 17800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Раствор фор-

миата натрия с заданной концентрацией готовили, растворяя нужное количество субстрата в 0.1 М натрий-фосфатном буфере, pH 7.0. Объем раствора доводили до метки в мерной колбе. Значения  $K_m$  рассчитывали из экспериментальных зависимостей методом нелинейной регрессии с помощью программы Origin Pro 2015.

### Изучение кинетики термоинактивации

Термостабильность ферментов измеряли в 0.1 М натрий-фосфатном буфере pH 7.0 при нескольких температурах. Пробирки объемом 0.5 мл, содержащие по 100 мкл раствора фермента (0.2 мг/мл), 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 FDH измеряли в трех повторах как описано выше. Константу скорости термоинактивации  $k_{in}$  определяли как тангенс угла наклона прямой зависимости натурального логарифма величины остаточной активности от времени (полулогарифмические координаты  $\ln(A/A_0) - t$ ) методом линейной регрессии, используя программу Origin Pro 8.1.

### Определение температурной стабильности методом дифференциальной сканирующей калориметрии

Исследование температурной стабильности проводили на дифференциальном адиабатическом сканирующем микрокалориметре Nano DSC (TA Instruments, США). Рабочий объем капиллярных калориметрических платиновых ячеек составлял 300 мкл. Для предотвращения образования пузырьков и закипания растворов при повышении температуры в ячейках калориметра поддерживали избыточное давление, равное 3 атм. Перед проведением эксперимента определяли значения инструментальной базовой линии, которые затем вычитали из данных, полученных для белка. При измерениях в контрольную ячейку помещали буферный раствор, а в рабочую – раствор исследуемой FDH в том же буферном растворе. Концентрация ферментов составляла 1–2 мг/мл, а скорость прогрева –  $1^\circ\text{C}/\text{мин}$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Выбор остатков для направленного мутагенеза

Ключевыми аминокислотными заменами в мутанте PseFDH SM4S являются замены C145S, C255A и A198G. Первые две замены позволили защитить

активный центр PseFDH от химической модификации и(или) окисления существенных остатков цистеина. Замена C255A привела к тому, что через 90 дней хранения при  $25^\circ\text{C}$  мутантный фермент сохранял более 60% исходной активности, в то время как PseFDH дикого типа за это время полностью инактивировалась [14]. Двойная замена C145S и C255A снизила константу скорости инактивации фермента в присутствии 100 мМ пероксида водорода почти в 100 раз [15]. Замена A198G обеспечивает снижение напряжения структуры PseFDH в повороте полипептидной цепи, соединяющем тяж бета-листа  $\beta\text{A}$  и спираль  $\alpha\text{B}$  в коферментсвязывающем домене активного центра. Такая замена приводила к увеличению термостабильности в 2.6 раза и улучшению константы Михаэлиса по  $\text{NAD}^+$  почти в 2 раза [11]. Поэтому основным направлением исследования по улучшению свойств PseFDH SM4S было увеличение температурной стабильности.

### Замены остатка Lys61

Увеличение pH среды с 7.0 до 8.0 приводит к увеличению константы скорости термоинактивации PseFDH в 6 раз [18]. Это может быть связано с разрушением ионных пар при повышении pH, например, за счет потери положительного заряда  $\epsilon$ -аминогруппы остатка лизина. Ранее при изучении термостабильности FDH из бактерий *Mycobacterium vaccae* N10 (отличается от PseFDH всего двумя заменами, одна из которых Glu61 в MysFDH и K61 в PseFDH, а по термостабильности первая хуже второй в 4 раза) показали, что замены Glu61K (переход к PseFDH) и Glu61Pro позволяют получить мутантную MysFDH по стабильности очень близкую к PseFDH [19]. Анализ структур апо- и холо-PseFDH (PDB2NAC и PDB2NAD соответственно) показывает, что аминокислотная группа остатка K61 образует ионную пару с карбоксильной группой Asp43. Введение в положение 61 остатка Pro с таким же стабилизационным эффектом, как у Lys61, означает, что в мутанте с заменой K61P при повышении pH не должно происходить разрушение ионной пары, отвечающей за поддержание структуры стабильного фермента. Кроме того, решено также ввести замену K61R, поскольку при повышении pH минимум до 12, его гуанидиниевая группа будет сохранять положительный заряд.

### Гидрофобизация остатков S131 и S160

Подход по стабилизации белков, основанный на гидрофобизации  $\alpha$ -спиралей, известен достаточно давно [20]. Наиболее часто в  $\alpha$ -спиралях проводят замены Ser/Ala – подход достаточно универсальный и эффективный для большого количества белков.



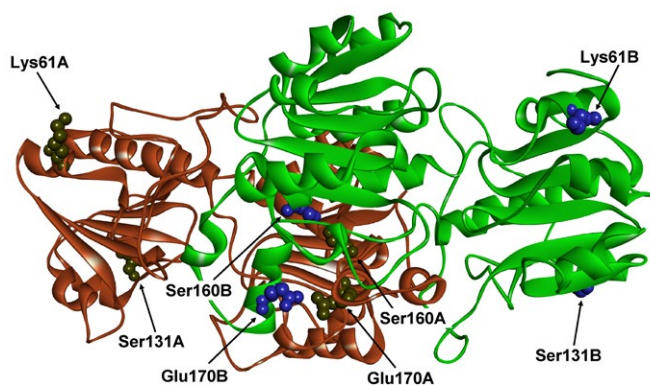


Рис. 1. Положения остатков Lys61, Ser131, Ser160 и Glu170 в структуре апо-формы FDH из *Pseudomonas* sp. 101 (PDB2NAC)

Например, с помощью этого подхода мы в несколько раз увеличили термостабильность оксидазы D-аминокислот [21]. Анализ структуры PseFDH выявил пять остатков Ser в  $\alpha$ -спиралях, из которых один оказался консервативным. Замена остальных четырех остатков показала, что наибольший стабилизирующий эффект (около 20% каждый) давали замены S131A и S160A [10]. Именно эти замены и были выбраны для введения в PseFDH SM4S.

### Замена Glu170Asp

Остаток Glu170 расположен в центре белковой глобулы в области межсубъединичного контакта (рис. 1). При этом отрицательно заряженные атомы кислорода карбоксильной группы остатка Glu170A одной субъединицы расположены на расстоянии всего 2.67 Å от атомов кислорода в карбоксильной группе Glu170B второй субъединицы (рис. 1). Простое удаление карбоксильных групп крайне нецелесообразно, поскольку эти же группы участвуют

в электростатических взаимодействиях, в частности, с гуанидиниевой группой остатков Arg173 из субъединиц A и B (расстояние 2.64 Å). Поэтому для уменьшения взаимного отталкивания без сильного изменения остальной системы взаимодействий Glu170 был заменен на Asp, который короче остатка Glu на одну  $\text{CH}_2$ -группу [22]. Отметим, что в положении 170 в FDH бактерий *Moraxella* sp. C2 (гомология с PseFDH 84%) расположены именно остатки Asp [23, 24]. Замена в PseFDH E170D привела к повышению термостабильности фермента на 40% [22].

Таким образом, в результате анализа выбрали пять аминокислотных замен в четырех положениях. Положение остатков для направленного мутагенеза показано на рис. 1. Отметим, что они расположены как на поверхности, так и внутри белковой глобулы, включая область межсубъединичного контакта, которая недоступна молекулам растворителя. Каждая из замен в случае PseFDH дикого типа не давала значительного увеличения стабильности (максимум до 40%), однако результаты наших предыдущих экспериментов позволяют предполагать наличие синергического эффекта, и эффект стабилизации при введении выбранных замен может быть выше.

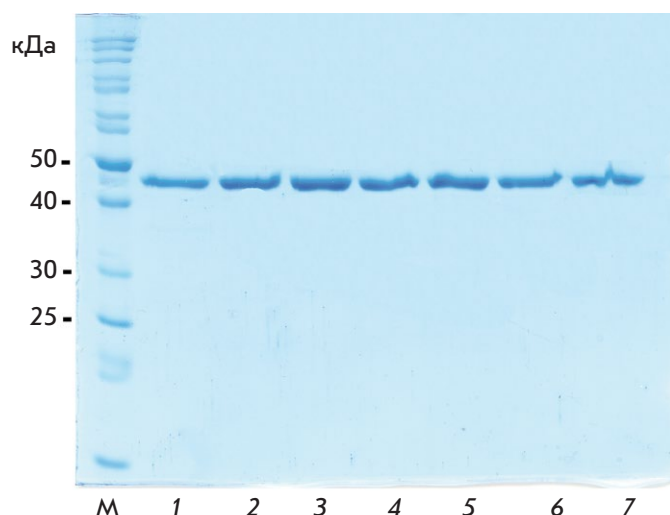
### Получение мутантных форм PseFDH SM4S

Новые мутантные PseFDH SM4S получены согласно методике, приведенной в «Экспериментальной части». Результаты секвенирования показали, что целевые гены содержат только запланированные нуклеотидные замены. Результаты экспрессии представлены в табл. 1. Для контроля параллельно экспрессировали исходную PseFDH SM4S и фермент дикого типа. Полученные данные позволяют сделать вывод, что используемая нами методика экспрессии PseFDH дикого типа применима и для получения новых мутантных форм. Выделение и очистку мутантных PseFDH проводили по стандартной мето-

Таблица 1. Экспрессия мутантных форм PseFDH и фермента дикого типа в клетках *E. coli*

Фермент	Выход фермента, активность, Ед/л среды	Выход биомассы, г/л среды	Выход фермента по массе*, мг/л среды	Содержание фермента в клетках, Ед/г
PseFDH wt	3875	13.5	388	287
PseFDH SM4S	5430	12.0	543	462
PseFDH SM4S K61P	4865	17.0	487	300
PseFDH SM4S K61R	4575	17.2	458	265
PseFDH SM4S S131A	5200	20.0	520	213
PseFDH SM4S S160A	5450	17.0	545	315
PseFDH SM4S E170D	6300	17.0	630	358

\*Выход фермента на 1 л среды рассчитывали исходя из выхода по активности (столбец 2) и величины удельной активности 10 Ед/мг белка.



**Рис. 2.** Аналитический электрофорез в 12% полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия препаратов ферментов после очистки. М – маркер молекулярной массы; 1 – PseFDH дикого типа; 2 – PseFDH SM4S; 3 – PseFDH SM4S K61P; 4 – PseFDH SM4S E170D; 5 – PseFDH SM4S K61R; 6 – PseFDH SM4S S131A; 7 – PseFDH SM4S S160A

дикое, разработанной в нашей лаборатории ранее [8]. На рис. 2 представлены результаты аналитического электрофореза препаратов мутантных форм PseFDH. Видно, что каждый препарат представлен единственной полосой, что свидетельствует об отсутствии примесей. Таким образом, получены препараты ферментов чистотой не менее 99%.

**Кинетические свойства мутантных ферментов**

Значения каталитических констант и констант Михаэлиса по NAD<sup>+</sup> и HCOO<sup>-</sup> для всех полученных мутантных PseFDH приведены в табл. 2. Отметим, что наблюдаемая каталитическая константа у всех форм PseFDH в пределах ошибки эксперимента

не изменилась. Небольшое увеличение константы Михаэлиса по формиату отмечено после замены S131A (на 60 и 40% по сравнению с исходной PseFDH SM4S и с ферментом дикого типа соответственно). Сходным образом на величину K<sub>M</sub> по формиату влияет и замена K61R. Константы Михаэлиса по NAD<sup>+</sup> у полученных мутантов в пределах ошибки эксперимента не отличаются (увеличение на 10–20% и уменьшение на 15–35% по сравнению с K<sub>M</sub> для PseFDH SM4S и фермента дикого типа соответственно). Как следствие таких изменений, каталитическая эффективность  $k_{cat}/K_M^{NAD^+}$  у всех мутантов была в 1.4 раза меньше по сравнению с PseFDH SM4S и не отличалась от таковой для фермента дикого типа. Величина  $k_{cat}/K_M^{HCOO^-}$  немного увеличилась после введения в PseFDH SM4S замен K61P и S160A. В целом, следует отметить, что введение замен не повлияло заметным образом на каталитические свойства фермента.

**Температурная стабильность мутантных форм PseFDH**

Термостабильность мутантных PseFDH изучали в диапазоне температур 65–69°C. В этом диапазоне термоинактивация фермента дикого типа протекает необратимо по мономолекулярному механизму в соответствии с кинетикой реакций первого порядка [19]. На рис. 3А в качестве примера в полулогарифмических координатах представлены зависимости остаточной активности мутантной PseFDH SM4S E170D от времени. Видно, что эти зависимости хорошо линеаризуются в полулогарифмических координатах, т.е. процесс инактивации протекает в соответствии с кинетикой реакций первого порядка. Из тангенса угла наклона прямых рассчитывается наблюдаемая константа скорости термоинактивации  $k_{in}$  первого порядка. На рис. 3Б представлены зависимости остаточной активности всех изучен-

**Таблица 2.** Кинетические параметры мутантных PseFDH и фермента дикого типа

Фермент	$k_{cat}, c^{-1}$	$K_M^{HCOO^-}, mM$	$K_M^{NAD^+}, \mu M$	$k_{cat}/K_M^{NAD^+}, (M^{-1}c^{-1}) \times 10^6$	$k_{cat}/K_M^{HCOO^-}, (M^{-1}c^{-1}) \times 10^3$
PseFDH wt	7.3 ± 0.3	1.63 ± 0.08	52.5 ± 2.5	0.14	4.47
PseFDH SM4S	7.3 ± 0.3	1.36 ± 0.14	35.5 ± 1.5	0.21	5.37
PseFDH SM4S K61P	7.3 ± 0.3	1.19 ± 0.08	48.3 ± 1.7	0.15	6.13
PseFDH SM4S K61R	7.7 ± 0.4	1.89 ± 0.11	45.8 ± 2.0	0.17	4.07
PseFDH SM4S S131A	7.5 ± 0.4	2.31 ± 0.15	48.6 ± 1.6	0.15	3.25
PseFDH SM4S S160A	7.3 ± 0.3	1.22 ± 0.12	48.6 ± 2.7	0.15	5.98
PseFDH SM4S E170D	7.3 ± 0.3	1.11 ± 0.08	41.0 ± 1.7	0.18	6.58

Примечание. 0.1 М натрий-фосфатный буфер, 0.01 М EDTA, pH 7.0, 30°C.

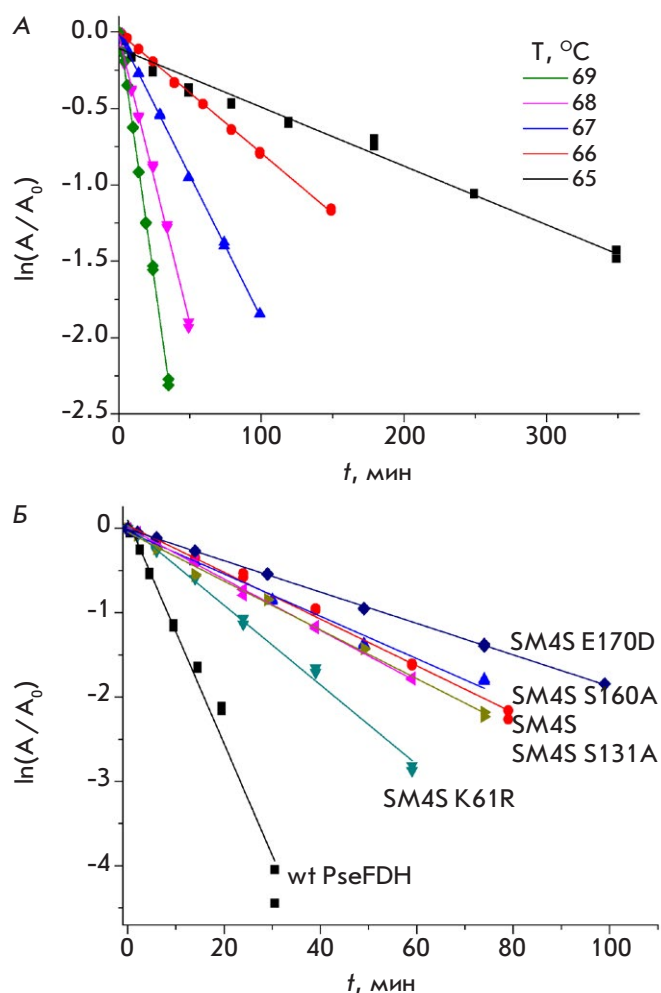


Рис. 3. А – зависимость остаточной активности PseFDH SM4S E170D от времени в координатах  $\ln(A/A_0) - t$ , при различных температурах. Б – зависимости остаточной активности PseFDH дикого типа и ее различных мутантов от времени в координатах  $\ln(A/A_0) - t$ , при 67°C. 0.1 М натрий-фосфатный буфер, pH 7.0

ных ферментов от времени в полулогарифмических координатах при 67°C. Из рис. 3Б хорошо видно, что наибольший эффект стабилизации вызывает замена E170D в PseFDH SM4S. Замена K61R приводит к небольшой дестабилизации по сравнению с PseFDH SM4S, но все равно стабильность этого мутанта была выше, чем у фермента дикого типа. Остальные мутанты обладают стабильностью, сходной со стабильностью PseFDH SM4S (рис. 3Б).

Интересные данные получены при анализе зависимости наблюдаемой константы скорости термоинактивации от температуры. Истинно мономолекулярный характер процесса инактивации PseFDH во всем диапазоне температур позволяет применить для анализа этого процесса теорию активированного комплекса (ТАК).

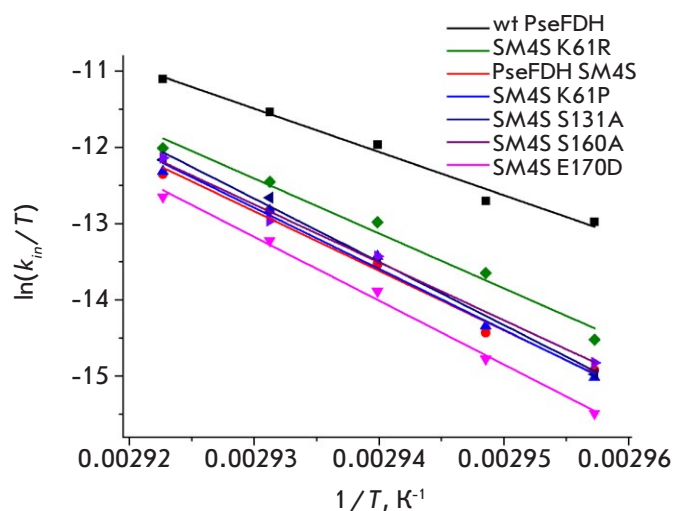


Рис. 4. Зависимости наблюдаемых констант скорости термоинактивации фермента дикого типа и мутантных PseFDH от температуры в координатах  $\ln(k_{in}/T) - 1/T$ . 0.1 М натрий-фосфатный буфер, pH 7.0

Согласно теории активированного комплекса, уравнение зависимости наблюдаемой константы скорости термоинактивации от температуры имеет следующий вид:

$$k_{in} = \frac{k_B T}{h} \cdot e^{-\left(\frac{\Delta G^\ddagger}{RT}\right)} = \frac{k_B T}{h} \cdot e^{-\left(\frac{\Delta H^\ddagger}{RT} - \frac{\Delta S^\ddagger}{R}\right)},$$

где  $k_B = 1.238 \times 10^{-23}$  Дж/К – постоянная Больцмана;  $h = 6.634 \times 10^{-34}$  Дж/с<sup>-1</sup> – постоянная Планка;  $R = 8.314$  Дж/моль/К – универсальная газовая постоянная.

Это уравнение можно представить в линейной форме:

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

где  $const = \ln\left(\frac{k_B}{h}\right) + \frac{\Delta S^\ddagger}{R}$ .

Зависимость в координатах  $\ln(k_{in}/T) - 1/T$  представляет собой прямую с тангенсом угла наклона, равным  $\Delta H^\ddagger/R$ . На рис. 4 представлены экспериментальные зависимости наблюдаемой константы скорости термоинактивации от температуры для всех полученных мутантов PseFDH. Из рис. 4 видно, что во всех случаях характер зависимости  $k_{in}$  примерно такой же, как и у исходной PseFDH SM4S. С помощью ТАК рассчитаны значения энтальпии ( $\Delta H^\ddagger$ ) и энтропии ( $\Delta S^\ddagger$ ) активации. Величина  $\Delta S^\ddagger$  может быть получена из тангенса угла наклона зависимости  $\Delta G^\ddagger$  от температуры согласно уравнению:

Таблица 3. Параметры процесса термоинактивации мутантных PseFDH и фермента дикого типа

Фермент	$\Delta H^\ddagger$ , кДж/моль	$\Delta S^\ddagger$ , Дж/моль/К	$\Delta H_{ДСК}$ , кДж/моль	Температура фазового перехода, $T_m$ , °C
PseFDH wt	470 ± 35	1100 ± 100	1470	68.3
PseFDH SM4S	650 ± 40	1600 ± 100	1975	70.9
PseFDH SM4S K61P	665 ± 40	1650 ± 100	1880	70.9
PseFDH SM4S K61R	600 ± 40	1450 ± 100	нд	нд
PseFDH SM4S S131A	630 ± 50	1720 ± 100	нд	нд
PseFDH SM4S S160A	690 ± 35	1550 ± 100	нд	нд
PseFDH SM4S E170D	700 ± 30	1730 ± 100	2070	71.4

Примечание. нд – нет данных. 0.1 М натрий-фосфатный буфер, pH 7.0.

$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger$$

Для нахождения энергии Гиббса активации использовано следующее выражение:

$$\Delta G^\ddagger = RT \left[ \ln \left( \frac{k_b}{h} \right) - \ln \left( \frac{k_m}{T} \right) \right] = RT \ln \left( \frac{k_b T}{k_m h} \right)$$

Из табл. 3 видно, что значения  $\Delta H^\ddagger$  и  $\Delta S^\ddagger$  у полученных мутантных форм и исходной PseFDH SM4S примерно одинаковы и достоверно выше, чем у фермента дикого типа. Наиболее высокое значение  $\Delta H^\ddagger$  наблюдается в случае мутанта с самым высоким эффектом стабилизации – PseFDH SM4S E170D (табл. 3).

Термостабильность некоторых наиболее интересных мутантных форм PseFDH также изучена методом дифференциальной сканирующей калориметрии. Так как мутанты обладали сходной стабильностью, то исследование термостабильности методом ДСК было сделано для фермента дикого типа, исходной PseFDH SM4S и ее вариантов с дополнительными заменами E170D и K61P (замены S131A и S160A давали близкий стабилизационный эффект). Результаты приведены на рис. 5. Численные значения теплоты плавления и температуры фазового перехода, рассчитанные из кривых плавления, представлены в табл. 3. Из рис. 5 и табл. 3 видно, что замена E170D приводит к самому большому повышению температуры максимума кривой плавления (на 0.5°C) по сравнению с исходной PseFDH SM4S. Такое увеличение хорошо согласуется с величиной эффекта стабилизации, наблюдаемого в экспериментах по изучению кинетики термоинактивации. Также замена E170D вызывает повышение удельной теплоты фазового перехода по сравнению с другими изученными мутантами и ферментом дикого типа (табл. 3), что согласуется с результатами анализа кинетики термоинактивации с помощью

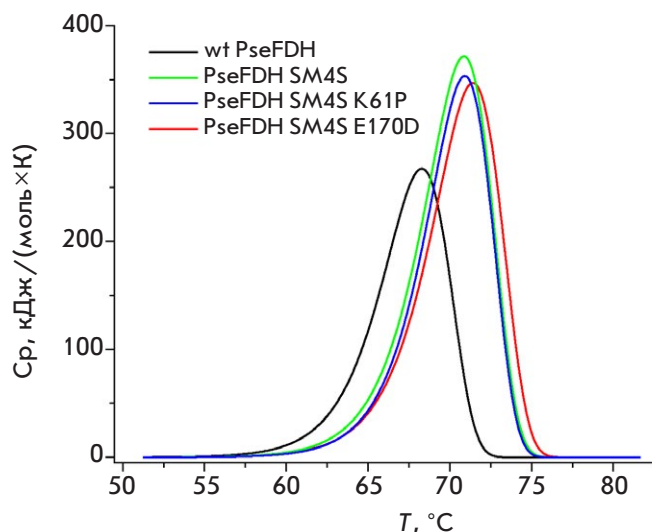


Рис. 5. Кривые плавления, полученные методом ДСК, для PseFDH дикого типа и мутантных ферментов. 0.1 М натрий-фосфатный буфер, 0.01 М EDTA, pH 7.0. Концентрация белка 2 мг/мл, скорость сканирования 1 град/мин

теории активированного комплекса. Таким образом, результаты экспериментов по исследованию термостабильности новых мутантных PseFDH двумя различными методами очень хорошо согласуются друг с другом.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В табл. 4 приведены величины относительной термостабильности новых полученных мутантных ферментов по сравнению к PseFDH дикого типа и к исходному мутанту PseFDH SM4S (значения в скобках) при различных температурах. Сравнение наблюдаемых значений эффектов стабилизации позволяют сделать несколько выводов.

1. Замены в положении 61 подтвердили важность остатка K61 в поддержании активной структуры



Таблица 4. Значения эффекта стабилизации\* мутантных ферментов по отношению к PseFDH дикого типа и PseFDH SM4S при различных температурах

Фермент	Эффект стабилизации, $k_{in}^{wt}/k_{in}^{mut}$ ( $k_{in}^{SM4S}/k_{in}^{mut}$ )				
	Температура, °C				
	65	66	67	68	69
PseFDH wt	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
PseFDH SM4S	7.03(1.0)	5.59(1.0)	4.86(1.0)	3.78(1.0)	3.62(1.0)
PseFDH SM4S K61R	4.43(0.63)	2.58(0.56)	2.75(0.57)	2.5(0.59)	2.48(0.61)
PseFDH SM4S K61P	7.70(1.1)	5.16(0.92)	4.30(0.90)	3.5(0.97)	3.4(0.97)
PseFDH SM4S S131A	7.39(1.05)	4.13(0.93)	4.5(0.93)	4.2(1.15)	2.9(0.83)
PseFDH SM4S S160A	6.35(0.90)	4.13(0.93)	4.3(0.90)	3.1(0.95)	2.81(0.81)
PseFDH SM4S E170D	12.40(1.76)	7.95(1.41)	6.85(1.42)	5.4(1.49)	4.7(1.35)

\*Эффект стабилизации рассчитан как отношение наблюдаемой константы скорости термоинактивации мутантно-го фермента к наблюдаемой константе скорости термоинактивации PseFDH дикого типа при данной температуре ( $k_{in}^{wt}/k_{in}^{mut}$ ). В скобках приведены соответствующие отношения  $k_{in}^{SM4S}/k_{in}^{mut}$ , в которых в качестве базовой была взята наблюдаемая константа скорости термоинактивации PseFDH SM4S.

0.1 М натрий-фосфатный буфер, 0.01 М EDTA, pH 7.0.

PseFDH. Несмотря на то что замена K61R привела к дестабилизации по сравнению с исходной PseFDH SM4S, стабильность такого мутанта была выше, чем у фермента дикого типа. Как уже отмечалось, введение в положение 61 остатка Pro вместо Lys имело целью удалить ионную пару без потери стабильности. Наши результаты подтвердили правильность этой гипотезы при pH 7.0. Также предполагалось, что удаление ионной пары может привести к повышению термостабильности фермента при повышении pH среды до 8.0. Данные предварительных экспериментов показали, что введение замены K61P в PseFDH SM4S при pH 8.0 и стандартной 0.1 М концентрации фосфатного буфера действительно приводит к снижению наблюдаемой константы скорости термоинактивации по сравнению с исходным ферментом. Однако работа в этом направлении будет продолжена в более широком диапазоне концентраций буфера, поскольку замена A198G в PseFDH SM4S вызывает изменение профиля зависимости константы скорости термоинактивации от концентрации буфера по сравнению с ферментом дикого типа [18].

2. Замены S131A, S160A не вызывают достоверного изменения в термостабильности PseFDH SM4S. Это, по-видимому, связано с тем, что даже в ферменте дикого типа эффект стабилизации составляет не более 20%, и такой эффект можно не зафиксировать в случае PseFDH SM4S, поскольку ее термостабильность при температурах 65–69°C в 3.6–7.0 раза выше, чем у PseFDH дикого типа.

3. Замена E170D в более термостабильной PseFDH SM4S вызывает при температуре 65°C в 2 раза больший эффект стабилизации белковой глобулы по сравнению с ферментом дикого типа, т.е. мы имеем сильный синергический эффект (200%). Кроме того, более высокая энтальпия активации  $\Delta H^\ddagger$  (700 и 470 кДж/моль у PseFDH SM4S E170D и фермента дикого типа соответственно) приводит к тому, что при температурах практического применения фермента (25–40°C) величина наблюдаемой константы скорости инактивации полученного мутанта будет в несколько тысяч (!!!) раз меньше, чем у фермента дикого типа. Полученный мутантный фермент при этих температурах будет в несколько сотен раз более стабильным даже по сравнению с исходной PseFDH SM4S.

4. Поскольку четыре точечные замены – K61P, S131A, S160A, E170D, как минимум, не изменяют (а даже увеличивают) термостабильность, а также очень незначительно влияют на кинетические параметры по сравнению с PseFDH SM4S, это открывает возможность объединения всех замен в многоточечные мутанты. Сильный синергический эффект после введения в PseFDH SM4S замены E170D подтверждает необходимость получения именно многоточечных мутантов, поскольку при объединении мутаций в одном ферменте нельзя исключить возникновения такого эффекта и в случае трех других аминокислотных замен. Предварительные расчеты по моделированию новых замен (данные будут представлены в отдель-

ной статье) показывают, что есть еще одна возможная замена, введение которой может привести к увеличению химической стабильности и заметному улучшению констант Михаэлиса как по  $\text{NAD}^+$ , так и по формиату. Работы в этом направлении обязательно будут продолжены. ●

*Работа выполнена частично при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – докторов наук (конкурс – МД-2021) МД-349.2021.1.4 и частично в рамках государственного задания.*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Egorov A.M., Avilova T.V., Dikov M.M., Popov V.O., Rodionov Y.V., Berezin I.V. // Eur. J. Biochem. 1979. V. 99. № 3. P. 569–576. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1979.tb13289.x>.
2. Tishkov V.I., Galkin A.G., Egorov A.M. // Dokl. USSR Acad. Sci. 1991. V. 317. № 3. P. 745–748.
3. Tishkov V.I., Galkin A.G., Marchenko G.N., Tsygankov Y.D., Egorov A.M. // Biotechnol. Appl. Biochem. 1993. V. 18. P. 201–207. DOI: 10.1111/j.1470-8744.1993.tb00266.x
4. Pometun A.A., Kleymenov S.Yu., Zarubina S.A., Kargov I.S., Parshin P.D., Sadykhov E.G., Savin S.S., Tishkov V.I. // Moscow Univ. Chem. Bull. 2018. V. 73. № 2. P. 80–84. DOI: 10.3103/S002713141802013X
5. Tishkov V.I., Popov V.O. // Biomol. Eng. 2006. V. 23. № 2–3. P. 89–110. DOI: 10.1016/j.bioeng.2006.02.003
6. Tishkov V.I., Pometun A.A., Stepashkina A.V., Fedorchuk V.V., Zarubina S.A., Kargov I.S., Atroshenko D.L., Parshin P.D., Kovalevski R.P., Boiko K.M., et al. // Moscow Univ. Chem. Bull. 2018. V. 73. № 2. P. 1–6. DOI: 10.3103/S0027131418020153
7. Pometun A.A., Boyko K.M., Yurchenko T.S., Nikolaeva A.Yu., Atroshenko D.L., Savin S.S., Popov V.O., Tishkov V.I. // Biochemistry (Moscow). 2020. V. 85. № 6. P. 689–696. DOI: 10.1134/S0006297920060061
8. Tishkov V.I., Matorin A.D., Rojkova A.M., Fedorchuk V.V., Savitsky A.P., Dementieva L.A., Lamzin V.S., Mezentzev A.V., Popov V.O. // FEBS Lett. 1996. V. 390. № 1. P. 104–108. DOI: 10.1016/0014-5793(96)00641-2
9. Galkin A.G., Kutsenko A.S., Bajulina N.P., Esipova N.G., Lamzin V.S., Mezentzev A.V., Shelukho D.V., Tikhonova T.V., Tishkov V.I., Ustinnikova T.B., et al. // Biochim. Biophys. Acta. 2002. V. 1594. № 1. P. 136–149. DOI: 10.1016/s0167-4838(01)00297-7
10. 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. DOI: 10.1016/S0014-5793(99)00127-1
11. Alekseeva A.A., Fedorchuk V.V., Zarubina S.A., Sadykhov E.G., Matorin A.D., Savin S.S., Tishkov V.I. // Acta Naturae. 2015. V. 7. № 1(24). P. 60–69. DOI: <https://doi.org/10.32607/20758251-2015-7-3-55-64>
12. Alekseeva A.A., Petrov A.S., Fedorchuk V.V., Fedorchuk E.A., Osipova T.A., Tishkov V.I. // Moscow Univ. Chem. Bull. 2014. V. 69. № 2. P. 73–79. DOI: 10.3103/S0027131414020023
13. Pometun A.A., Parshin P.D., Galanicheva N.P., Uporov I.V., Atroshenko D.L., Savin S.S., Tishkov V.I. // Moscow Univ. Chem. Bull. 2020. V. 75. № 4. P. 250–257. DOI: 10.3103/S0027131420040057
14. Одинцева Е.Р., Попова А.С., Рожкова А.М., Тишков В.И. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2002. Т. 43. № 6. С. 356–359.
15. Savin S.S., Tishkov V.I. // Acta Naturae. 2010. V. 2. № 1(4). P. 97–101. DOI: 10.32607/20758251-2010-2-1-97-101
16. Alekseeva A.A., Kargov I.S., Kleimenov S.Yu., Savin S.S., Tishkov V.I. // Acta Naturae. 2015. V. 7. № 3(26). P. 55–64. DOI: 10.32607/20758251-2015-7-3-55-64
17. Tishkov V.I., Goncharenko K.V., Alekseeva A.A., Kleymenov S.Yu., Savin S.S. // Biochemistry (Moscow). 2015. V. 80. № 13. P. 1690–1700. DOI: 10.1134/S000629791513005
18. Voinova N.S., Savin S.S., Alekseeva A.A., Skirgello O.E., Tishkov V.I. // Moscow Univ. Chem. Bull. 2008. V. 63. № 2. P. 60–62. DOI: 10.3103/S0027131408020028
19. Fedorchuk V.V., Galkin A.G., Yasny I.E., Kulakova L.B., Rojkova A.M., Filippova A.A., Tishkov V.I. // Biochemistry (Moscow). 2002. V. 67. № 10. P. 1145–1151. DOI: 10.1023/A:1020915324159
20. Munoz V., Serrano L. // J. Mol. Biol. 1995. V. 245. № 3. P. 275–296. DOI: 10.1006/jmbi.1994.0023
21. Golubev I.V., Komarova N.V., Ryzhenkova K.V., Chubar T.A., Savin S.S., Tishkov V.I. // Acta Naturae. 2014. V. 6. № 3(22). P. 76–88. DOI: 10.32607/20758251-2014-6-3-76-88
22. Федорчук В.В. Повышение термостабильности бактериальной формиатдегидрогеназы методом направленного мутагенеза: Дис. ... канд. хим. наук. М.: МГУ им М.В. Ломоносова, 2000.
23. 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. DOI: 10.1107/S0907444909040773
24. Shabalin I.G., Polyakov K.M., Tishkov V.I., Popov V.O. // Acta Naturae. 2009. V. 1. № 3. P. 89–93. DOI: 10.32607/20758251-2009-1-3-89-93