

УДК 577.15.1

## РАЦИОНАЛЬНЫЙ ДИЗАЙН ПРАКТИЧЕСКИ ВАЖНЫХ ФЕРМЕНТОВ

В.И. Тишков<sup>1,2,3,\*</sup>, А.А. Пометун<sup>2,3</sup>, А.В. Степашкина<sup>2,3</sup>, В.В. Федорчук<sup>1,2</sup>, С.А. Зарубина<sup>1,2</sup>, И.С. Каргов<sup>1,2,3</sup>, Д.Л. Атрошенко<sup>1,2</sup>, П.Д. Паршин<sup>1,2</sup>, М.Д. Шеломов<sup>1,2</sup>, Р.П. Ковалевский<sup>1,2</sup>, К.М. Бойко<sup>3</sup>, М.А. Эльдаров<sup>3</sup>, Э. Д'Оронцо<sup>4</sup>, Ф. Секундо<sup>4</sup>, С.С. Савин<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>кафедра химической энзимологии химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова; <sup>2</sup>ООО «Инновации и высокие технологии МГУ»; <sup>3</sup>Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН; <sup>4</sup>Институт химии молекулярного распознавания, CNR, Италия; \*e-mail: vitishkov@gmail.com)

Большинство природных ферментов непригодны для практического применения. Развитие методов геномного секвенирования и различных подходов белковой инженерии позволяет найти и оптимизировать свойства определенного фермента для конкретного процесса. В данном обзоре рассмотрены результаты по созданию новых биокатализаторов на основе биоинформационного поиска и рационального дизайна. Были клонированы новые гены формиадегидрогеназ (ФДГ) из бактерий *Staphylococcus aureus* (SauFDH), термотолератных дрожжей *Ogataea parapolymorpha* (OpaFDH), пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (SceFDH) и мха *Physcomitrella patens* (PraFDH). Новые ФДГ были получены в активной форме и охарактеризованы. Показано, что SauFDH имеет как минимум вдвое большую каталитическую константу по сравнению со всеми описанными ФДГ. OpaFDH имеет такие же хорошие каталитические параметры, как мутанты ФДГ из сои, и превосходит последние по термостабильности. Получены кристаллы апо- и холо-форм SauFDH. Замена двух остатков Cys в ФДГ из бактерии *Pseudomonas* sp. 101 (PseFDH) позволила получить препараты фермента с улучшенными кинетическими параметрами и повышенной температурной и химической стабильностью. Получены препараты PseFDH нового поколения с измененной коферментной специфичностью от NAD<sup>+</sup> к NADP<sup>+</sup>. Исследовано влияние ионных жидкостей на каталитические свойства и термостабильность шести рекомбинантных ФДГ дикого типа, а также ряда мутантов. В случае оксидазы D-аминокислот (DAAO) проведено объединение единичных положительных мутаций в многоточечные мутанты. Показано, что введение аминокислотных замен вызывает аддитивный эффект, улучшая кинетические параметры и повышая температурную и химическую стабильность. Клонированы гены DAAO из дрожжей *Hansenula polymorpha*. Ген гидролазы эфиров α-аминокислот (АЕН) был клонирован и экспрессирован в клетках *E. coli* в активной форме. Проведено моделирование структуры фермента и исследована эффективность при синтезе аминокислот. Смоделирована структура одноцепочечной формы пенициллинацилазы из бактерий *Alcaligenes faecalis* (scAfPA) и с помощью PCR получен ген scAfPA. Два варианта scAfPA были экспрессированы в клетках *E. coli*, выделены и охарактеризованы. Каталитические свойства scAfPA оказались несколько выше, чем у природного гетеродимера.

**Ключевые слова:** формиадегидрогеназа, оксидаза D-аминокислот, пенициллинацилаза, гидролаза эфиров α-аминокислот, рациональный дизайн, кинетические свойства, стабильность.

В настоящее время абсолютное большинство биокатализаторов на основе ферментов получают с помощью методов генетической инженерии. Для снижения себестоимости их получения необходимы высокопродуктивные рекомбинантные штаммы (суперпродуценты целевых ферментов). Кроме того, необходимо предварительное проведение

целенаправленного изменения свойств природных ферментов для создания оптимальных условий разрабатываемого процесса.

В нашей лаборатории проводятся систематические исследования по клонированию генов и белковой инженерии практически значимых ферментов. В данном обзоре рассмотрены последние

достижения по изучению формиадегидрогеназы, оксидазы D-аминокислот, гидролазы эфиров  $\alpha$ -аминокислот и пенициллинацилазы (АЕН), а также пенициллинацилазы.

### Формиадегидрогеназа

Результаты, полученные разными исследователями по клонированию и белковой инженерии формиадегидрогеназ (ФДГ, КФ 1.2.1.2), можно найти в наших обзорах, опубликованных в 2004, 2006 и 2011 гг. [1–3]. Были клонированы гены формиадегидрогеназ из бактерий *Pseudomonas* sp. 101 (PseFDH), *Mycobacterium vaccae* N10 (MycFDH), дрожжей *Candida boidinii* (CboFDH), растений *Arabidopsis thaliana* (AraFDH) и сои *Glycine max* (SoyFDH). В ходе биоинформационного поиска мы обнаружили гены формиадегидрогеназ как в бактериях и дрожжах, так и в растениях. При анализе аминокислотных последовательностей этих ФДГ мы обратили внимание на ферменты из бактерий *Staphylococcus aureus* (SauFDH), термотолерантных дрожжей *Ogataea parapolyomorpha* (OraFDH), пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (SceFDH) и мха *Physcomitrella patens* (PraFDH).

#### Формиадегидрогеназа из *Staphylococcus aureus*

Этот фермент был выбран по двум причинам. Во-первых, он обладает очень низкой гомологией по отношению к другим ФДГ. В случае SauFDH гомология по отношению ко всем ФДГ составляет менее 40%, в то время как между другими ФДГ уровень гомологии превышает 50% [2, 3]. В стафилококках ФДГ играет ключевую роль при росте бактерий в виде биопленки. Уровень ее биосинтеза в этом случае возрастает во много раз (до 20).

Анализ литературы показал, что имеются два варианта аннотации гена SauFDH, которые мы назвали «укороченный» и «удлиненный» (позже «полноразмерный»). Более подробно данный вопрос рассмотрен в работе [4]. С помощью ПЦР мы клонировали оба варианта гена. Последующие эксперименты показали, что «полноразмерный» вариант (SauFDH1) по всем параметрам превосходит «укороченный», поэтому в дальнейшем с ним и проводились все работы. Рекомбинантная SauFDH1 очень эффективно экспрессировалась в клетках *E. coli*. Уровень экспрессии составлял 40% (и выше) всего растворимого белка клетки. Выход фермента после оптимизации условий культивирования в качалочных колбах составил более 1 г целевого фермента с 1 л среды, а с учетом более

высокой каталитической константы SauFDH1 по сравнению с другими ФДГ выход по активности составил до 22 тыс. ед. активности с 1 л среды, в то время как лучший результат для других ФДГ не превышал 6–7 тыс. ед. активности с 1 л среды. Очистку фермента проводили по стандартной методике, разработанной нами еще для PseFDH. Высокая термостабильность позволила ввести стадию термообработки препарата биомассы сразу после разрушения ультразвуком без отделения осадка. В результате уже после этой стадии чистота фермента составила не менее 80%. Гомогенный препарат был получен после одной стадии гидрофобной хроматографии.

#### Формиадегидрогеназа из термотолерантных метилотрофных дрожжей *Ogataea parapolyomorpha*

Геном дрожжей *Ogataea parapolyomorpha* DL-1 (прежнее название *Hansenula polymorpha* DL-1) был секвенирован в Центре биоинженерии РАН (в настоящее время подразделение Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии») РАН (Gene Bank Accession AEOI01000012) по заказу академика РАН О.А. Донцовой, в лаборатории которой изучаются структура и каталитический механизм теломеразы из этих дрожжей. При аннотации генома была найдена открытая рамка считывания длиной 1089 оснований (locus\_tag = «HPODL\_3660»), которая кодировала формиадегидрогеназу. Клонирование гена OraFDH проводили с помощью ПЦР и специфических праймеров, которые после стартового кодона содержали дополнительный триплет, кодирующий остаток Gly. Хромосомная ДНК была любезно предоставлена О.А. Донцовой. Фермент также очень хорошо экспрессировался в клетках *E. coli* (более 40% всего растворимого белка клетки). Выход составил более 1 г целевого белка или 6000 ед. активности с 1 л среды. Ген OraFDH был также экспрессирован в клетках *E. coli* другими авторами [5], однако он был не клонирован, а синтезирован. На N-конце был сохранен остаток Lys, а на C-конец была добавлена последовательность из шести остатков His, которая была использована для аффинной хроматографии. Уровень экспрессии и выход после очистки в работе не приведены.

#### Формиадегидрогеназа из пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

Анализ генома пекарских дрожжей свидетельствует, что на XV хромосоме должен находиться настоящий ген, а на XVI хромосоме – псевдоген.

Мы синтезировали набор праймеров, комплементарных последовательностям, примыкающим к гену ФДГ на XV хромосоме. Полученный фрагмент был клонирован и секвенирован. Оказалось, что в нашем случае это тоже псевдоген (все 10 секвенированных фрагментов на расстоянии 22 нуклеотидов от стартового кодона содержали кодон ТАТ вместо ТАС). Поэтому мы провели ПЦР со специфическими праймерами на псевдоген ФДГ с XVI хромосомы. Секвенирование полученного фрагмента показало, что он соответствует гену ФДГ, однако на расстоянии 434 нуклеотидов от стартового кодона имеется дополнительная вставка из четырех АААА, что приводит к появлению стоп-кодона и сдвигу рамки считывания. Поскольку оба клонированных фрагмента на расстоянии 116 нуклеотидов от начала ген содержали сайт рестрикции SphI, то нормальный ген был получен клонированием фрагмента из 116 нуклеотидов (NcoI-SphI) из псевдогена с хромосомы XVI в клонированный фрагмент из хромосомы XV.

Анализ частоты использования кодонов в гене SacFDH показал наличие в нем ряда редких для *E. coli* кодонов – 6 кодонов AGA и 10 кодонов AGG. Поэтому в качестве штамма-хозяина использовали клетки *E. coli* BL21(DE3)CodonPlus/pLysS, которые в хромосоме содержат гены вышеуказанных тРНК и ряд других редких для *E. coli* кодонов (например, CCC). Для выделения фермента использовали стандартную методику, разработанную для ФДГ (разрушение клеток ультразвуком, фракционирование сульфатом аммония, гидрофобная хроматография в нисходящем градиенте концентрации сульфата аммония).

#### Формиатдегидрогеназа из мха *Physcomitrella patens*

Ранее все формиатдегидрогеназы клонировали из высших растений (картофель [6], рис [7], соя, *A. thaliana* [8], ], лотос японский [9]). Для мха *Physcomitrella patens* сравнительно недавно было проведено секвенирование генома, кроме того, известно, что мхи растут при более суровых условиях, поэтому нам было интересно провести клонирование гена ФДГ из этого организма. Ген PpaFDH был идентифицирован в геноме *P. patens*. В нем оказалось несколько интронов. Поэтому клонирование проводили через мРНК. Сначала была выделена тотальная фракция мРНК. С помощью праймера олиго-dT и обратной транскриптазы была получена тотальная кДНК. Затем с помощью ПЦР при использовании специфических праймеров был получен фрагмент с кДНК гена PpaFDH, который

был клонирован по сайтам NcoI и HindIII.

Все растительные ФДГ имеют на N-конце сигнальный пептид, который отвечает за транспорт синтезированного про-белка из цитоплазмы в митохондрии [3]. После этого сигнальный пептид отщепляется и получается активный фермент. Попытки экспрессировать полноразмерный про-белок ФДГ из картофеля приводили к образованию нерастворимых телец включения [6]. В случае других растительных ФДГ для экспрессии в клетках *E. coli* из гена предварительно удаляли последовательность сигнального пептида. Работа с PpaFDH позволила нам впервые в мире получить растворимый и активный про-белок с сигнальным пептидом, последовательность которого оказалось одной из самых длинных.

#### Каталитические свойства новых формиатдегидрогеназ

Значения каталитических констант и констант Михаэлиса ( $K_M$ ) по формиату и коферменту  $NAD^+$  представлены в таблице. Отметим самые важные моменты.

1. Стафилококковая ФДГ имеет каталитическую константу в три раза превышающую этот показатель самой активной до данного момента ФДГ из бактерий *Pseudomonas* sp. 101. К сожалению, SauFDH имеет самые худшие значения констант Михаэлиса. Как следует из таблицы, по сравнению с другими ФДГ они в 4–28 и 20–85 хуже в случае кофермента и формиата соответственно. В настоящее время мы проводим эксперименты по улучшению каталитических параметров SauFDH. Получены мутанты, у которых значения  $K_M$  по обоим субстратам снижены в несколько раз.

2. Неожиданно хорошие каталитические параметры продемонстрировала ФДГ из *O. paprapolyomorpha*. По значениями  $K_M$  она не уступает ФДГ из сои (SoyFDH) и имеет более высокую (на 60%) каталитическую константу (таблица). При этом OpaFDH значительно превосходит SoyFDH дикого типа по термостабильности (см. ниже). Самый лучший мутант SoyFDH Phe290Glu имеет сравнимые с OpaFDH каталитическую константу и константу Михаэлиса по коферменту, но значения  $K_M$  по формиату в два раза хуже. У SoyFDH F290E намного более высокая термостабильность по сравнению с ФДГ из сои дикого типа, но все равно по данному параметру этот мутант уступает OpaFDH дикого типа.

Как следует из таблицы, введение на C-конец OpaFDH последовательности из шести остатков His привело к сильному ухудшению (в 16 раз!) константы Михаэлиса по коферменту и снижению

## Каталитические параметры рекомбинантных формиатдегидрогеназ

Тип ФДГ	$k_{\text{кат.}}, \text{с}^{-1}$	$K_M^{\text{NAD}^+}, \text{мкМ}$	$K_M^{\text{HCOO}^-}, \text{мМ}$	Источник
PseFDH дикий тип	7,3	65	6,5	[1]
Мутант PseFDH SM4	7,3	45	1,5	[10]
SauFDH «удлиненный»	<b>25</b>	220	130	[4]
SauFDH «укороченный»	н.о.*	510	320	[4]
CboFDH дикий тип	3,7	37	5,9	[1]
OpaFDH дикий тип	4,6	14	1,3	[11]
OpaFDH-His <sub>6</sub>	2,3	83	0,83	[5]
AthFDH дикий тип	3,8	50	2,8	[8]
SoyFDH дикий тип	2,9	13	1,5	[12]
SoyFDH F290E	4,7	13,7	2,9	[12]
SoyFDH F290D	5,1	12,8	5,0	[13]
SceFDH дикий тип	6,5	36	5,5	[11]
PpaFDH дикий тип	3,4	39	2,6	[11]

\*н.о. – не определен.

величины каталитической константы в два раза [5]. Значение  $K_M$  по формиату стало в два раза лучше, чем у нашего варианта OpaFDH, но для регенерации NADH в процессах хирального синтеза концентрация кофермента должна соответствовать  $K_M$  по NAD<sup>+</sup>, а концентрация формиата должна быть насыщающей.

3. ФДГ из пекарских дрожжей и мха демонстрировали каталитические параметры среднего уровня.

Таким образом, анализ данных таблицы свидетельствует, что ФДГ из стафилококков и термотолерантных дрожжей представляют собой большой интерес для применения на практике.

### Термостабильность новых формиатдегидрогеназ

Термостабильность ферментов изучали двумя методами – по кинетике термоинактивации и с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК). В случае кинетики термоинактивации оказалось, что ФДГ из пекарских дрожжей имеет самую низкую среди описанных формиатдегидрогеназ термостабильность, причем инактивация до 40 °С обратима, а выше 40 °С необратима. В случае остальных ФДГ термоинактивация необратима и протекает по мономолекулярному механизму. PpaFDH имеет термостабильность среднюю между SoyFDH и CboFDH. Неожиданно высокую термостабильность продемонстрировали OpaFDH и особен-

но SauFDH. OpaFDH имеет третью по величине термостабильность среди всех описанных формиатдегидрогеназ, а SauFDH делит первое место с PseFDH.

Изучение термостабильности новых ФДГ с помощью ДСК подробно представлено в работе [14]. Отметим, что результаты данных экспериментов полностью коррелируют с результатами исследования термостабильности по кинетике термоинактивации.

### Химическая стабильность новых формиатдегидрогеназ

Операционная стабильность ферментов – один из ключевых параметров, определяющих применение фермента на практике. В случае формиатдегидрогеназ стабильность при нормальной температуре определяется скоростью окисления отдельных остатков цистеина. Для сравнения химической стабильности разных ФДГ используется константа скорости инактивации в присутствии 0,1 М пероксида водорода [15]. ФДГ из растений и особенно из стафилококков имеют наименьшее количество остатков Cys, расположенных вне активного центра. В результате даже SoyFDH и SauFDH дикого типа демонстрируют высокую стабильность против инактивации пероксидом водорода. В случае ФДГ из бактерий *Pseudomonas* sp. 101 ранее был идентифицирован остаток Cys255 в кофермент связывающем домене, замена которого на остаток Ala приводила к

существенной стабилизации, однако не предотвращала полную инактивацию [16]. Были проведены замены еще двух остатков Cys и оказалось, что вторым существенным остатком является Cys145. Его замена позволила получить мутантную PseFDH, сравнимой по химической стабильности с SoyFDH и SauFDH.

### Изменение коферментной специфичности ФДГ от NAD<sup>+</sup> к NADP<sup>+</sup>

Практически все природные ФДГ представляют собой ферменты, высокоспецифичные с NAD<sup>+</sup>. Исключением являются ФДГ из бактерий *Burkholderia stabilis* [17] и *Granulicella mallensis* MP5ACTX8 [18]. Первая версия мутантной PseFDH с измененной специфичностью от NAD<sup>+</sup> к NADP<sup>+</sup> была получена нами еще в 1993 г. [1]. Для дальнейшего улучшения каталитических свойств были проведены дополнительные замены, в том числе Ala198Gly, что увеличило каталитическую константу и стабильность [19]. Вторая замена Asp221Gln позволила получить мутантный фермент с NADP<sup>+</sup>, обладающий каталитическими свойствами, сравнимыми с таковыми у PseFDH дикого типа с NAD<sup>+</sup> [20].

### Структурные исследования новых формиадегидрогеназ

Обязательным условием для проведения экспериментов по рациональному дизайну является наличие экспериментальной (или теоретической) структуры целевого фермента. Мы провели эксперименты по кристаллизации апо- и холо-форм SauFDH. В результате первичного скрининга были протестированы 1728 вариантов условий кристаллизации. Найдены условия (один вариант для апо- и два варианта для холо-форм), при которых для обеих форм получались кристаллы размером 10 мкм, непригодные, к сожалению, для кристаллографических исследований. Дальнейшая оптимизация условий кристаллизации позволила получить для апо- и холо-форм кристаллы размером соответственно 200 и 40 мкм, пригодные для определения структуры методом РСА. В дальнейшем эти кристаллы будут использованы для сбора данных и решения структур.

### Оксидаза D-аминокислот

Ранее нами были получены точечные мутанты оксидазы D-аминокислот (КФ 1.4.3.3) из дрожжей *Trygonopsis variabilis* [21–24]. Эти замены были направлены на улучшение каталитических свойств и стабильности фермента. Показано, что

замена остатков Met на остатки Leu не приводит к повышению химической стабильности DAAO. Ряд замен был объединен в два многоточечных мутанта [25]. Установлено, что объединение замен имеет аддитивный эффект. В настоящее время получены новые многоточечные мутанты, имеющие более высокую активность с цефалоспорином С, а также повышенную температурную и химическую стабильность.

В дополнение к исследованиям по DAAO из *Trygonopsis variabilis* нами начаты работы по DAAO из термотолерантных дрожжей *Hansenula polymorpha* (*Ogataea parapolyomorpha*). На основе анализа генома были идентифицированы три потенциальных гена DAAO и один ген D-аспаратоксидазы. Получены штаммы с нокаутом по одному из генов. Клонированы сами гены и начаты эксперименты по экспрессии генов DAAO в клетках *E. coli*.

### Гидролаза эфиров α-аминокислот

В настоящее время для синтеза β-лактамных антибиотиков (пенициллинов и цефалоспоринов) используется пенициллинацилаза (ПА) из *E. coli*. Одной из критических стадий технологического процесса является первый этап получения ацил-фермента. В качестве донора ацильной части ПА используют амиды, представляющие собой достаточно стабильные соединения. Гораздо быстрее протекает получение ацил-фермента при использовании эфиров, однако в случае ПА этот процесс трудноосуществим в силу высокой кислотности (рН 8) реакции синтеза антибиотиков, при которой ПА катализирует реакцию. При таком значении рН эфиры быстро гидролизуются. В качестве альтернативы можно использовать гидролазу эфиров α-аминокислот (АЕН, КФ 3.1.1.43) для получения α-амино-β-лактамов (например, ампициллина или цефалексина). Нами был клонирован ген АЕН из *Xanthomonas rubrilineans* ВКПМ В-9915. Фермент был успешно экспрессирован в клетках *E. coli* и очищен. Показано, что рекомбинантная АЕН намного эффективнее в синтезе цефалексина [26]. Была построена модельная трехмерная структура АЕН как свободной, так и в комплексе с субстратами и продуктами [27] и предложены перспективные положения для мутагенеза с целью улучшения каталитических свойств.

### Одноцепочечная пенициллинацилаза

Пенициллинацилаза (ПА; КФ 3.5.1.11) широко применяется в промышленности при получении полусинтетических β-лактамных антибиотиков,

в тонком органическом синтезе для разделения смеси рацематов и получения оптически чистых энантиомеров, а также для защиты amino- и гидроксильных групп в пептидном синтезе. Различные ПА из ряда бактерий и грибов были клонированы и изучены. Наиболее изучена ПА из бактерий *Escherichia coli* (EcPA). Однако у этого фермента есть ряд существенных недостатков (например, довольно узкий pH-оптимум активности), что ограничивает его применение на практике. Альтернативным источником ПА служит более перспективный фермент из грамотрицательных бактерий *Alcaligenes faecalis* VKM B-1518 (DSM) (AfPA), обладающий более высокой (по сравнению с ферментом из *E. coli*) термостабильностью и более широким pH-оптимумом активности, смещенным в щелочную область. Кодирующий ПА *pac*-ген транслируется в виде полипептида-предшественника, содержащего сигнальный пептид,  $\alpha$ -субъединицу, спейсер и  $\beta$ -субъединицу, на N-конце которой находится каталитический остаток серина  $\beta$ Ser1. Экспрессия *pac*-гена и биосинтез полипептида-предшественника протекают в цитоплазме клетки *E. coli*, в то время как процесс созревания до активного гетеродимера локализован в периплазме клетки *E. coli*. Созревание ПА в бактериальном штамме-продуценте заключается в посттрансляционной модификации, включающей транспортировку полипептида-предшественника из цитоплазмы в периплазму с отщеплением сигнального пептида и последующее выщепление спейсера с образованием активного гетеродимерного фермента. Указанные процессы представляют собой скорость-лимитирующие стадии созревания ПА. На примере EcPA [28] было показано, что введение аминокислотных замен даже внутри субъединиц влияет на эффективность и скорость процессинга и, следовательно, на количество синтезируемого фермента. Поэтому было предложено создать новую генно-инженерную конструкцию, кодирующую одноцепочечную (пермутированную) AfPA, которая не подвергается процессингу, а сразу приводит к образованию активного фермента в цитоплазме клетки *E. coli*. С позиции фундаментальной науки, получение одноцепочечной формы ПА позволяет установить новые структурно-функциональные закономерности. С точки зрения практической значи-

мости, создание новой генетической конструкции, обеспечивающей отсутствие процессинга, позволяет, исключив длительный этап оптимизации условий культивирования для каждой мутантной формы, стандартизовать эти условия.

Для целенаправленного получения одноцепочечного фермента было проведено компьютерное моделирование структуры sc-AfPA [29]. Анализ трехмерной структуры AfPA дикого типа (wt-AfPA) показал, что N-конец  $\alpha$ -субъединицы и C-конец  $\beta$ -субъединицы пространственно сближены и образуют  $\beta$ -тяж, что позволяет соединить N- и C-концы коротким линкером. В процессе компьютерного моделирования рассматривались разные варианты линкера, различающиеся по аминокислотному составу и длине, в результате были выбраны две наиболее перспективные сшивки. Отличия между ними заключались в отсутствии остатка Pro551 на C-конце  $\beta$ -субъединицы в случае одного варианта одноцепочечной AfPA (scAfPA2).

Процедура получения гена одноцепочечной sc-AfPA включала проведение трех реакций ПЦР. Была создана система экспрессии и проведено культивирование рекомбинантных штаммов-продуцентов. Показано, что обе формы синтезируются в активной и растворимой формах. После оптимизации выход составил до 1000 ед. активности с 1 л среды, а время культивирования составило 20 ч в отличие от 65 ч для фермента дикого типа.

Обе формы были очищены до гомогенного состояния. Были определены каталитические свойства и изучена термостабильность. Оказалось, что обе формы одноцепочечной AfPA имеют немного более высокую каталитическую константу и немного более низкие значения  $K_M$ , однако показатель термостабильности был примерно на 30% ниже. Также было показано, что повышение концентрации фосфатного буфера приводит к существенной термостабилизации как фермента дикого типа, так и одноцепочечных форм AfPA.

Таким образом, в ходе выполнения работ нами были получены новые ферменты с уникальными свойствами, а также проведены эксперименты по рациональному дизайну практически значимых ферментов, которые также позволили создать мутантные ферменты с улучшенными свойствами и даже с новой структурой.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 16-14-00043) и Российского фонда фундаментальных исследований (проекты № 15-54-78035, № 17-04-01469а, № 17-04-01487а и № 17-04-01662а).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Тишков В.И., Попов В.О. // Биохимия. 2004. Vol. 69. № 11. P. 1537.
2. Tishkov V.I., Popov V.O. // Biomol. Eng. 2006. Vol. 23. N 2–3. P. 89.
3. Алексеева А.А., Савин С.С., Тишков В.И. // Acta Naturae. 2011. Vol. 3. N 4(11). P. 40.
4. Каргов И.С. Дис. ... канд. хим. наук. М., 2017. 140 с.
5. Yu S., Zhu L., Zhou C., An T., Zhang T., Jiang B., Mu W. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2014. Vol. 98. N 4. P. 1621.
6. Colas des Francs-Small C., Ambard-Bretteville F., Small I. D., Remy R. // Plant. Physiol. 1993. Vol. 102. N 4. P. 1171.
7. Shiraishi T., Fukusaki E., Kobayashi A. // J. Biosci. Bioeng. 2000. Vol. 89. N 3. P. 241.
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. Vol. 47. N 1. P. 31.
9. Andreadeli A., Flemetakis E., Axarli I., Dimou M., Udvardi M.K., Katinakis P., Labrou N.E. // Biochim. Biophys. Acta. 2009. Vol. 1794. N 6. P. 976.
10. Tishkov V.I., Goncharenko K.V., Alekseeva A.A., Kleymenov S.Yu., Savin S.S. // Biochemistry(Moscow). 2015. Vol. 80. N 13. P. 1690.
11. Пометун (Алексеева) А.А., Зарубина С.А., Паршин П.А., Каргов И.С., Савин С.С., Тишков В.И. // Acta Naturae. 2016. S 2. P. 33.
12. Alekseeva A.A., Serenko A.A., Kargov I.S., Savin S.S., Kleymenov S.Yu., Tishkov V.I. // Protein Eng. Des. Sel. 2012. Vol. 25. N 11. P. 781.
13. Kargov I.S., Kleymenov S.Y., Savin S.S., Tishkov V.I., Alekseeva A.A. // Protein Eng. Des. Sel. 2015. Vol. 28. N 6. P. 171.
14. Пометун А.А., Клейменов С.Ю., Зарубина С.А., Каргов И.С., Паршин П.Д., Садыхов Э.Г., Савин С.С., Тишков В.И. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2018. Т. 59. № 2. С. 164.
15. Савин С.С., Тишков В.И. // Acta Naturae. 2010. Т. 2. № 1(4). P. 80.
16. Tishkov V.I., Galkin A.G., Marchenko G.N., Egorova O.A., Sheluho D.V., Kulakova L.B., Dementieva L.A., Egorov A.M. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1993. Vol. 192. N 2. P. 976.
17. Hatrongjit R., Packdibamrung K. // Enz. Microbial Technol. 2010. Vol. 46. N 7. P. 557.
18. Fogal S., Beneventi E., Cendron L., Bergantino E. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2015. Vol. 99. N 22. P. 9541.
19. Алексеева А.А., Федорчук В.В., Зарубина С.А., Садыхов Э.Г., Маторин А.Д., Савин С.С., Тишков В.И. // Acta Naturae. 2015. Vol. 7. N 1(24). P. 64.
20. Alekseeva A., Dolina I., Kargov I., Savin S., Tishkov V. // Prot.Sci. 2015. Vol. 24. N S 1. P. 174.
21. Комарова Н.В., Голубев И.В., Хороненкова С.В., Тишков В.И. // Изв. АН. Сер. химическая. 2012. Т. 61. № 7. С. 1472.
22. Комарова Н.В., Голубев И.В., Хороненкова С.В., Чубарь Т.А., Тишков В.И. // Биохимия. 2012. Т. 77. № 10. С. 1423.
23. Голубев И.В., Комарова Н.В., Рыженкова К.В., Чубарь Т.А., Савин С.С., Тишков В.И. // Acta Naturae. 2014. Vol. 6. N 3(22). P. 82.
24. Атрошенко Д.Л., Голубев И.В., Савин С.С., Тишков В.И. // Вестн. Моск. ун-та, Сер. 2. Химия, 2016. Т. 57. № 4. С. 252.
25. Атрошенко Д.Л., Зарубина С.А., Шеломов М.Д., Голубев И.В., Савин С.С., Тишков В.И. // Вестн. Моск. ун-та, Сер. 2. Химия. 2017. Т. 58. № 5. С. 257.
26. Складенко А.В., Березина О.В., Сатарова Д.Э., Федорчук В.В., Федорчук Е.А., Савин С.С., Яроцкий С.В., Тишков В.И. // Вестн. Моск. ун-та, Сер. 2. Химия. 2014. Т. 55. № 2. С. 86.
27. Зарубина С.А., Упоров И.В., Федорчук Е.А., Федорчук В.В., Складенко А.В., Яроцкий С.В., Тишков В.И. // Acta Naturae. 2013. Vol. 5. N 4(19). P. 51.
28. Ясная А.С. // Дис. ... канд. наук. М., 2009. 128 с.
29. Степашкина А.В. // Дис. ... канд. наук. М., 2017. 164 с.

Поступила в редакцию 09.01.18

## RATIONAL DESIGN OF PRACTICALLY IMPORTANT ENZYMES

V.I. Tishkov<sup>1,2,3\*</sup>, A.A. Pometun<sup>2,3</sup>, A.V. Stepashkina<sup>2,3</sup>, V.V. Fedorchuk<sup>1,2</sup>, S.A. Zarubina<sup>1,2</sup>, I.S. Kargov<sup>1,2,3</sup>, D.L. Atroshenko<sup>1,2</sup>, P.D. Parshin<sup>1,2</sup>, M.D. Shelomov<sup>1,2</sup>, R.P. Kovalevski<sup>1,2</sup>, K.M. Boiko<sup>3</sup>, M.A. Eldarov<sup>3</sup>, E. D'Oronzo<sup>4</sup>, F. Secundo<sup>4</sup>, S.S. Savin<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>Department of Chemistry, M.V. Lomonosov Moscow State University; <sup>2</sup>Innovations and High Technologies MSU Ltd; <sup>3</sup>A.N. Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences, <sup>4</sup>Istituto di Chimica del Riconoscimento Molecolare, CNR, Via Mario Bianco 9, 20131 Milan, Italy; \*e-mail: vitishkov@gmail.com)

Native enzymes usually do not have properties which are fully suitable for application in biotechnological processes. That is why that practically all enzymes are subjected to directed modification of properties before practical application. In present report we will present examples of rational design of some practically important enzymes. Formate dehydrogenase (FDH, EC 1.2.1.2). We cloned genes of new FDHs from bacterium *Staphylococcus aureus*, thermotolerant yeast *Ogataea parapolymorpha*, bakery yeast

*Saccharomyces cerevisiae* and moss *Physcomitrella patens* (SauFDH, OpaFDH, SceFDH and PpaFDH, respectively). It was found that SauFDH has the highest value of specific activity compared to other FDHs. OpaFDH shows the same low  $K_M$  values with formate and  $NAD^+$  as plant FDHs but it has much higher thermal stability. PpaFDH is the first case when active recombinant enzyme was obtained with full length signal peptide. Chemical stability of FDH from *Pseudomonas* sp. 101 was improved at least by four orders. Wild-type SauFDH and mutant PseFDH show the best chemical stability compared to all described FDHs. Wild-type and mutant FDHs from bacteria, yeasts and plants were tested for activity and stability in ionic liquids. There were different effects of amino acid changes on surface of protein globule on stability and activity FDHs in water and ionic liquids. New highly efficient mutant PseFDHs with changed coenzyme specificity from  $NAD^+$  to  $NADP^+$  were obtained. D-amino acid oxidase (DAAO, EC 1.4.3.3). Different multi-points mutants (mpmDAAO) of yeast DAAO have been prepared. mpmDAAO showed better chemical stability and higher activity with cephalosporin C compared to wild-type enzyme.  $\alpha$ -Amino acid esters hydrolase (AEH, EC 3.1.1.43). Gene of AEH from *Xanthomonas rubrilineans* (XrAEH) has been cloned and overexpressed in *E. coli*. It was shown that recombinant XrAEH is more efficient compared to native XrAEH. Structure of single-chain penicillin acylase (EC 3.5.1.11) from *Alcaligenes faecalis* (scAIPA) has been modeled and gene of the enzyme was prepared with PCR. scAIPA was expressed in *E. coli* cells and recombinant enzyme was purified and characterized.

**Key words:** D-amino acid oxidase, Cephalosporin C, site-directed mutagenesis, rational design, kinetic properties, thermal stability.

**Сведения об авторах:** Тишков Владимир Иванович – профессор химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова; зав. лабораторией молекулярной инженерии Института биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН; ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», докт. хим. наук (vitishkov@gmail.com); Пометун Анастасия Александровна – науч. сотр. Института биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, ст. науч. сотр. ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», канд. хим. наук (aapometun@gmail.com); Степашкина Анастасия Владимировна – мл. науч. сотр. Института биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, науч. сотр. ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», канд. хим. наук (a.stepashkina@gmail.com); Федорчук Владимир Витальевич – ст. науч. сотр. химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, сотр. ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», канд. хим. наук (vfedorchuk@gmail.com); Зарубина София Александровна – аспирант химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, мл. науч. сотр. ООО «Инновации и высокие технологии МГУ» (zarubina.sophia@gmail.com); Каргов Иван Сергеевич – аспирант химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, мл. науч. сотр. ООО «Инновации и высокие технологии МГУ» (ikar\_xix@gamil.com); Атрошенко Денис Леонидович – аспирант химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, мл. науч. сотр. ООО «Инновации и высокие технологии МГУ» (atrdenis@gmail.com); Паршин Павел Дмитриевич – студент химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (parshin.p04@gmail.com); Шеломов Михаил Дмитриевич – студент химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, сотр. ООО «Инновации и высокие технологии МГУ»; Ковалевский Ростислав Петрович – студент химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, сотр. ООО «Инновации и высокие технологии МГУ» (rpkovalevskiy@gmail.com); Бойко Константин Михайлович – ст. науч. сотр. Института биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, ст. науч. сотр. ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», канд. физ.-матем. наук (boiko\_konstantin@exchange.inbi.ras.ru); Эльдаров Михаил Анатольевич – вед. науч. сотр. Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, канд. биол. наук (eldarov1@yandex.ru); Эрика Д'Оронцо – аспирант Института химии молекулярного распознавания, CNR, Италия (erica.doronzo@icrm.cnr.it); Секундо Франческо – профессор Института химии молекулярного распознавания, CNR, Италия (francesco.secundo@icrm.cnr.it); Савин Святослав Сергеевич – науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», канд. биол. наук (avinslava@gmail.com).