

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

УДК 577.151

**ИНЖЕНЕРИЯ АКТИВНОГО ЦЕНТРА ФОРМИАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ
ИЗ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*: ВВЕДЕНИЕ В СТРУКТУРУ
ДОПОЛНИТЕЛЬНОЙ ПЕТЛИ И ОСТАТКОВ ГИСТИДИНА**

Татьяна Сергеевна Юрченко¹, Анастасия Аркадьевна Логинова², Егор Павлович Сергеев³, Евгений Владимирович Пометун⁴, Владимир Иванович Тишков⁵, Святослав Сергеевич Савин⁶, Анастасия Александровна Пометун^{1-3, 5-7}

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
химический факультет

^{1, 5, 7} Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук

⁴ Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет)

Автор, ответственный за переписку: Анастасия Александровна Пометун,
aapometun@gmail.com; Владимир Иванович Тишков, vitishkov@gmail.com

Аннотация. NAD^+ -зависимая формиатдегидрогеназа (КФ 1.2.1.2, FDH) из патогенных бактерий *Staphylococcus aureus* (SauFDH) значительно отличается от других FDH как по первичной структуре, так и по каталитическим свойствам. Отличительной особенностью SauFDH является самая высокая (примерно в 2,5–3 раза) удельная активность по сравнению с другими формиатдегидрогеназами. При этом SauFDH обладает высокими значениями констант Михаэлиса по обоим субстратам. На основании анализа трехмерных структур и выравнивания аминокислотных последовательностей были выбраны замены, перспективные с точки зрения изменения каталитических параметров. Замена I220N привела к увеличению K^{NAD^+} ; значение k_{cat} не изменилось. При замене T250N наблюдается увеличение $K_M^{\text{NAD}^+}$, k_{cat} снижается с 20 до 13 с^{-1} . Замена K368N привела к незначительному увеличению $K_M^{\text{NAD}^+}$, k_{cat} снизилась с 20 до 6 с^{-1} . Введение дополнительных вставок TGA и AGA в α -спираль на С-конец фермента привело к увеличению $K_M^{\text{NAD}^+}$ и $K_M^{\text{HCOO}^-}$. Большой эффект наблюдался для $K_M^{\text{NAD}^+}$ – разница составила более чем в 10 раз. Для мутантных SauFDH со вставками k_{cat} значительно снижается до 4 с^{-1} . Аналогичные результаты наблюдаются для мутантов с многоточечными заменами. Таким образом, было показано, что С-концевая последовательность играет важную роль в катализе SauFDH.

Ключевые слова: NAD^+ -зависимая формиатдегидрогеназа, сайт-направленный мутагенез, *Staphylococcus aureus*, структура, С-конец, моделирование

DOI: 10.55959/MSU0579-9384-2-2023-64-2-163-177

Список сокращений: FDH – формиатдегидрогеназа, NaPB – натрий-фосфатный буфер.

Финансирование. Исследование выполнено при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 20-04-00915 и частично в рамках государственного задания.

Для цитирования: Юрченко Т.С., Логинова А.А., Пометун Е.В., Тишков В.И., Савин С.С., Пометун А.А. Инженерия активного центра формиатдегидрогеназы из *Staphylococcus aureus*: введение в структуру дополнительной петли и остатков гистидина // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. Т. 64. № 2. С. 163–177.

ORIGINAL ARTICLE

ENGINEERING THE ACTIVE SITE OF FORMATE DEHYDROGENASE FROM *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*: INTRODUCTION TO THE STRUCTURE OF THE ADDITIONAL LOOP AND HISTIDINE RESIDUES**Tatiana S. Iurchenko¹, Anastasia A. Loginova², Egor P. Sergeev³, Evgenii V. Pometun⁴, Vladimir I. Tishkov⁵, Svyatoslav S. Savin⁶, Anastasia A. Pometun⁷**^{1-3, 5-7} Department of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation^{1, 5, 7} Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Centre “Fundamentals of Biotechnology” of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation⁴ Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation

Abstract. NAD⁺-dependent formate dehydrogenase (EC 1.2.1.2, FDH) from pathogenic bacterium *Staphylococcus aureus* (SauFDH) differs significantly from other FDHs both in terms of primary structure and catalytic properties. A distinctive feature of SauFDH is the highest (about 2.5–3 times) specific activity compared to other formate dehydrogenases. At the same time, SauFDH has high Michaelis constants for both substrates. Based on the analysis of three-dimensional structures and the alignment of amino acid sequences, substitutions promising in terms of changing catalytic parameters were selected. The replacement of I220H resulted in an increase in $K_M^{\text{NAD}^+}$; the value of k_{cat} has not changed. When T250H is replaced, an increase in $K_M^{\text{NAD}^+}$ is observed, k_{cat} decreases from 20 to 13 s⁻¹. The replacement of K368H led to a slight increase in $K_M^{\text{NAD}^+}$, k_{cat} decreased from 20 s⁻¹ to 6 s⁻¹. The introduction of TGA and AGA additional inserts in α -helix at the C-terminus of the enzyme led to an increase in $K_M^{\text{NAD}^+}$ and $K_M^{\text{HCOO}^-}$. A bigger effect was observed for $K_M^{\text{NAD}^+}$ – the difference was more than 10 times. For mutant SauFDH with insertions k_{cat} significantly reduced to 4 s⁻¹. Similar results were observed for mutants with multipoint substitutions. Thus, the C-terminal sequence has been shown to play an important role in the catalysis of SauFDH.

Keywords: NAD⁺-dependent formate dehydrogenase, site-directed mutagenesis, *Staphylococcus aureus*, structure, C-terminus, modeling

Financial Support. The research was carried out with partial financial support of the Russian Foundation for Basic Research within the framework of scientific project No. 20-04-00915 and partially as a part of state research program.

For citation: Iurchenko T.S., Loginova A.A., Sergeev E.P., Pometun E.V., Tishkov V.I., Savin S.S., Pometun A.A. Engineering the Active Site of Formate Dehydrogenase from *Staphylococcus aureus*: Introduction to the Structure of the Additional Loop and Histidine Residues // Vestn. Mosk. un-ta. Ser. 2. Chemistry. T. 64. № 2. P. 163–177.

NAD(P)⁺-зависимая форматдегидрогеназа (КФ 1.2.1.2, FDH) катализирует реакцию окисления формат-иона до углекислого газа с сопряженным восстановлением NAD(P)⁺ до NAD(P)H. FDH состоит из двух идентичных субъединиц, каждая из которых состоит из кофермент-связывающего (остатки с 147 по 333 для форматдегидрогеназы из *Pseudomonas* sp. 101 (PseFDH)) и каталитического (аминокислотные остатки

1–146 и 334–400) доменов. Каждая субъединица содержит активный центр, который располагается в глубине белковой глобулы.

Гены FDH обнаружены в бактериях, дрожжах, грибах и растениях (как высших, так и низших) [1–3]. Показано, что при неблагоприятных условиях содержание мРНК, кодирующей FDH, резко возрастает. Соответственно, данный фермент играет важную роль в метаболизме клеток.

В частности, это касается патогенных бактерий при образовании ими биопленок [4].

В настоящее время применение FDH в качестве катализатора регенерации никотинамидных кофакторов NAD(P)H в ферментативных системах стало традиционным [5–8]. Это объясняется тем, что FDH выгодно выделяется на фоне других ферментов с аналогичной функцией благодаря низкой стоимости субстрата (НСОО⁻) и летучести реакционного продукта. Однако, согласно литературным данным, во всем мире по-прежнему ведется активный поиск новых перспективных с точки зрения биотехнологии FDH.

Объектом настоящего исследования стала форма дегидрогеназа из патогенных бактерий *Staphylococcus aureus* (SauFDH). Филогенетический анализ аминокислотных последовательностей FDH выявил низкий уровень гомологии представителей семейства стафилококковых по сравнению с другими бактериальными FDH при сохранении той же функции. SauFDH обладает самым высоким значением каталитической константы относительно всех описанных FDH из других источников и очень хорошей температурной стабильностью [9, 10]. Недостаток этого фермента – высокие значения констант Михаэлиса [9]. Для этого фермента были также успешно проведены эксперименты по кристаллизации [10]. В результате была получена экспериментальная структура двойного комплекса [SauFDH–NAD⁺] (PDB:6TTB).

Настоящая работа посвящена выяснению взаимосвязи структура – функция в SauFDH с помощью белковой инженерии. Методом сайт-направленного мутагенеза проведено исследование влияния на свойства фермента замены аминокислотного остатка I220, а также нескольких аминокислотных остатков, расположенных в районе С-конца фермента.

Экспериментальная часть

Моделирование структуры

Структурный анализ и моделирование мутантов проводили с помощью программы AlphaFold2 [11] на открытом онлайн-сервере для ColabFold [12]. Для множественного выравнивания использовали MMseqs2, для каждой модели проводили по 3 цикла уточнения предсказания. Генерировали по 5 моделей, лучшую выбирали по значению pLDDT (тест предсказанной точности на локальном расстоянии, predicted local distance difference test). Для встраивания молекулы NAD⁺ с последующей оптимизацией пространственного расположения использовали Coot [13]. Для визуализации применяли PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.1.0, Schrödinger, LLC).

Сайт-направленный мутагенез

Сайт-направленный мутагенез проводили методом ПЦР на «ThermoCycler T100» («Bio-Rad», Россия). В состав реакционной смеси (25 мкл) входило 2,5 мкл буфера 10×Pfu (20 мМ Трис-НСl (рН 8,8 при 25 °С), 10 мМ КСl, 10 мМ (NH₄)₂SO₄, 2 мМ MgSO₄ и 0,1% Triton X-100), 2 мкл dNTP (по 2,5 мМ), 1 мкл ДНК-матрицы pET24a с геном SauFDH1 (10 нг/мкл), 2 мкл прямого и обратного праймеров (10 пмоль/мкл, «Синтол», Россия), 0,5 мкл ДНК-полимеразы Pfu (10 Ед/мкл, «Thermo Fisher Scientific», США) и 15 мкл деионизированной воды. ПЦР проводили в тонкостенных пробирках объемом 0,5 мл («Eppendorf», Германия). Реакционную пробирку инкубировали в течение 5 мин при 95 °С, затем 30 циклов по 30 с при 95 °С, 60 с при 60–62 °С и 2 мин при 72 °С. С помощью двух пар олигонуклеотидов (SauFor/T7rev и SauRev/T7for) были получены два фрагмента гена с необходимыми мутациями. Используемые олигонуклеотиды приведены ниже.

Используемые олигонуклеотиды

T7_for	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'
T7_rev	5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'
I220H_for:	5'-STATGATCCACATAATCAACAAGACCATAAATTGTC-3'
I220H_rev:	5'-CTTGTTGATTATGTGGATCATAGTGTGTAATGTTAC-3'
T250H_for:	5'-CATGCACCATACATCCAGAAACTGATAACTTATTTG-3'
T250H_rev:	5'-CAGTTTCTGGATGTAATGGTGCATGAATTGTAATC-3'
K368H_for:	5'-GTCGTATTGCTAGTCATAGTTATACAGCTAAATAATAG-3'
K368H_rev:	5'-CTGTATAACTATGACTAGCAATACGACCACTTG-3'
TGA_K368H_for:	5'-GTCGTATTGCTAGTACCGCGCGCATAGTTATACAGCTAAATAATAG-3'
TGA_K368H_rev:	5'-CTGTATAACTATGCGCGCCGGTACTAGCAATACGACCAC-3'
AGA_K368H_for:	5'-GTGGTCGTATTGCTAGTGCGGGCGCGCATAGTTATACAGCTAAATAATAG-3'
AGA_K368H_rev:	5'-CTGTATAACTATGCGCGCCCGCACTAGCAATACGACCAC-3'

Продукты ПЦР первых двух реакций очищали с применением набора для экстракции из геля («Thermo Fisher Scientific», США) и использовали в качестве ДНК-матрицы в третьей ПЦР с праймерами T7 for и T7 rev. Продукт третьей ПЦР и плазмидную ДНК обрабатывали эндонуклеазами рестрикции EcoRI и HindIII («Thermo Fisher Scientific», США). Фрагменты с целевыми мутациями очищали и клонировали в те же сайты исходной ДНК-матрицы. Клеточная линия *E. coli* DH5 α трансформировалась продуктами лигирования. Нарботанную плазмидную ДНК выделяли с помощью набора GeneJET Miniprep Kit («Thermo Fisher Scientific», США). Полученные генетические конструкции секвенировали с использованием генетического анализатора «Applied Biosystems 3100», который подтвердил, что все плазмиды имели только заданные мутации.

Экспрессия *SauFDH* дикого типа и мутантных форм

SauFDH экспрессировали в клетках *E. coli* BL21(DE3) CodonPlus/pLysS, как описано ранее [13]. Клетки трансформировали соответствующей плазмидой с использованием CaCl₂, далее использовали тепловой шок и выращивали культуру в течение ночи при 37 °С на чашках Петри с твердой питательной средой 2YT (16 г/л бактотриптона, 10 г/л дрожжевого экстракта, 1,2% агара, pH 7,2) с 30 мкг/мл канамицина и 25 мкг/мл хлорамфеникола. Индивидуальные колонии переносили в пробирки с 4 мл среды 2YT, содержащей канамицин и хлорамфеникол той же концентрации. Клеточную культуру термостатировали при 30 °С и 180 об/мин до достижения оптической плотности при 600 нм $A_{600} = 1,0\text{--}1,2$ ОЕ. Затем клетки переносили в колбы объемом 250 мл с 25 мл среды 2YT (разбавление 1:1000) и культивировали при 37 °С и 120 об/мин до достижения оптической плотности $A_{600} = 0,6\text{--}0,8$ ОЕ. После этого суспензию клеток количественно переносили в колбы (1 л с 225 мл среды 2YT) и культивировали при 30 °С и 90 об/мин. Индукцию проводили раствором лактозы (10 мл, 300 г/л) при достижении значения оптической плотности $A_{600} = 0,6\text{--}0,8$ ОЕ; после чего клетки культивировали в течение ночи при 20 °С и 120 об/мин. Биомассу собирали на центрифуге «Eppendorf 5403» («Eppendorf», Германия) (30 мин, 6000 об/мин, +4 °С). Клетки ресуспендировали в 0,1 М натрий-фосфатном буфере, pH 8,0 (концентра-

ция 20%, мас./об.). Полученную суспензию хранили при –20 °С.

Очистка ферментов

Выделение и очистку ферментов осуществляли по стандартной методике, описанной в работе [10]. Суспензию клеток обрабатывали ультразвуком при +4 °С с последующей тепловой обработкой при 55 °С в течение 15 мин. Осадок отделяли центрифугированием, к супернатанту добавляли раствор сульфата аммония до насыщения 40% в 0,1 М натрий-фосфатном буфере, pH 7,0 (раствор А). Полученный осадок центрифугировали, содержание сульфата аммония в супернатанте доводили до 90% твердым сульфатом аммония и выдерживали осадок при +4 °С в течение 4 ч. Осадок собирали и перерастворили в 1,8 М (NH₄)₂SO₄ в буфере А (раствор Б).

Нерастворившиеся белки были отделены центрифугированием, полученный раствор наносили на колонку 1×10 см с Phenyl-Sepharose Fast Flow («Pharmacia Biotech», Швеция), уравновешенную раствором А. Колонку промывали раствором А до исчезновения поглощения на 280 нм. *SauFDH* элюировали с использованием линейного градиента 1,8–0,0 М (NH₄)₂SO₄ в 0,1 М натрий-фосфатном буферном растворе (pH 7,0) (общий объем градиента 150 мл). Собирали фракции по 5 мл, измеряли поглощение на 280 нм (A_{280}) и ферментативную активность (A). Фракции с наибольшим отношением A/A_{280} собирали, концентрировали и обессоливали гель-фильтрацией через колонку «Sephadex G-25 Fine» («Pharmacia Biotech», Швеция). Концентрирование осуществляли с помощью центрифужных концентраторов «Amicon Ultra-15» («Millipore», США). Степень очистки препаратов анализировали с помощью ПААГ-электрофореза (концентрация геля 12%) в денатурирующих условиях в присутствии 0,1% додецилсульфата натрия. Препараты ферментов хранили при +4 °С в 0,1 М натрий-фосфатном буферном растворе (pH 7,0).

Кинетический анализ

Активность *FDH* определяли при 30 °С по увеличению поглощения продукта реакции NADH при 340 нм ($\epsilon_{340} = 6220 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) с использованием спектрофотометра «Shimadzu UV 1800PC». Точные концентрации исходных растворов NAD⁺ определяли спектрофотометрически на длине волны 260 нм ($\epsilon_{260} = 17\,800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Для определения значений V_m и K_M исследовали зависимость

скорости реакции от концентрации варьируемого субстрата в диапазоне 0,5–15 K_M . Диапазон концентраций NAD^+ при постоянной насыщающей концентрации второго субстрата ($\geq 10 K_M$ для NAD^+ и $\geq 20 K_M$ для формиата) составил:

0,15–5 мМ NAD^+ для SauFDH I220H и K368H;
0,2–8,0 мМ для SauFDH T250H;

1,7–50,0 мМ для SauFDH TGA + K368H,
AGA + K368H и I220H + T250H + TGA +
+ K368H;

2–75 мМ для SauFDH I220H + TGA + K368H
или 0,05–2,50 М формиата натрия для
SauFDH I220H, T250H, K368H и I220H +
+ TGA + K368H;

0,1–5,0 М для SauFDH TGA + K368H, AGA +
+ K368H и I220H + T250H + TGA + K368H).

Каждое измерение проводили в трех повторах. Численные значения максимальной скорости и констант Михаэлиса получали, анализируя экспериментальные зависимости методом нелинейной регрессии (Origin Pro 8.5).

Определение концентрации активных центров и каталитической константы

Концентрацию ФДГ определяли методом Бредфорда по поглощению комплекса с кумасси бриллиантовый синий G-250 при 595 нм с помощью спектрофотометра «Shimadzu UV 1800PC» [15]. Использовали серию стандартов с концентрацией бычьего сывороточного альбумина (БСА) 0,001–0,020 мг/мл.

Определение констант скорости термоинактивации

Температурную стабильность SauFDH изучали по кинетике инактивации в 0,1 М натрий-фосфатном буферном растворе (рН 7,0) в широком диапазоне температур. Для фермента дикого типа он составил 60–64 °С. Для ферментов SauFDH I220H, K368H, TGA + K368H и AGA + K368H температурный диапазон составил 62–70 °С, для ферментов T250H, I220H + TGA + K368H и I220H + T250H + TGA + K368H – 60–68 °С. Через фиксированные промежутки времени пробирку переносили из бани в контейнер со льдом на 1 мин. Затем раствор центрифугировали в течение 1 мин при 12 000 об/мин на центрифуге «Eppendorf 5430». Остаточную активность FDH измеряли, как описано ранее. Константу скорости термической инактивации рассчитывали по наклону линейной зависимости $\ln(A/A_0)$ от времени (полулогарифмические координаты $\ln(A/A_0) - t$) в программе Origin Pro

8.5. Для каждого эксперимента готовили серию пробирок Eppendorf (0,5 мл) с 70 мкл раствора фермента (0,2 мг/мл). Пробирки инкубировали в водном термостате (точность термостатирования $\pm 0,1$ °С). Через фиксированные интервалы времени отбирали одну пробирку и помещали ее в лед на 1 мин. Затем раствор центрифугировали 1 мин при 12 000 об/мин на центрифуге «Eppendorf 5430» и измеряли остаточную активность. Значение константы скорости термоинактивации k_{in} рассчитывали как тангенс угла наклона прямой на графике зависимости натурального логарифма величины остаточной активности от времени в полулогарифмических координатах ($\ln(A/A_0) - t$) методом линейной регрессии (OriginPro 8.5).

Результаты экспериментов

Выбор аминокислотных остатков для мутагенеза

Анализ полученной ранее структуры (PDB:6TTB) показал, что SauFDH состоит из двух идентичных субъединиц, одна из которых имеет закрытую конформацию активного центра, в котором находится кофермент NAD^+ (холоформа). Вторая субъединица соответствует апоформе фермента, поскольку активный центр находится в открытой конформации и не содержит кофермент. Трехмерные структуры субъединиц SauFDH в апо- и холо-конформациях очень близки к соответствующим формам формиатдегидрогеназы из *Pseudomonas* sp. 101 (PseFDH, структуры PDB:2NAC и PDB:2NAD соответственно). Среднеквадратичные отклонения RMSD между структурами PDB:6TTB (открытая) – PDB:2NAC и PDB:6TTB (закрытая) – PDB:2NAD составляют 1,530 и 1,170 Å соответственно. Сравнение показало, что в холо-форме структуры более близкие, чем в случае апо-конформации. Это достаточно убедительно указывает на то, что структуры активных центров SauFDH и PseFDH должны быть очень близки. Этот факт позволяет проводить сравнение структур известных формиатдегидрогеназ для выявления общих закономерностей связи структура – функция и использовать данные сравнения структур для экспериментов по белковой инженерии методом рационального дизайна.

Большинство формиатдегидрогеназ имеет подвижный С-конец, который не виден в структуре, определенной методом рентгеноструктурного анализа. В случае SauFDH в структуре не

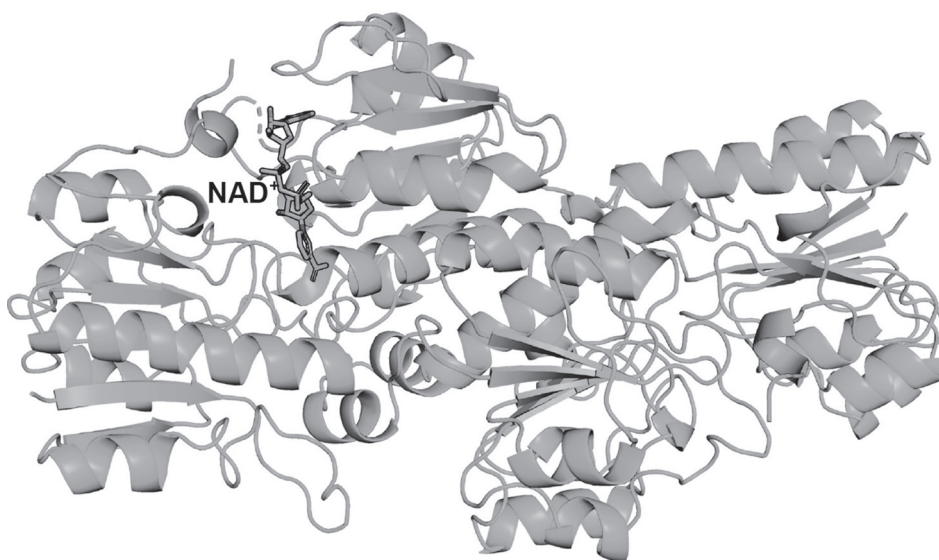


Рис. 1. Модельная структура SauFDH, построенная с использованием открытого онлайн сервера AlphaFold2 – ColabFold

разрешен С-концевой участок из 10 аминокислотных остатков RIASKSYТАК, хотя, согласно данным MALDI/TOF/TOF-спектрометрии, этот фрагмент в белке присутствует. В аминокислотной последовательности PseFDH 400 аминокислотных остатков и в структуре холо-формы PDB:2AND не разрешены только последние семь. С учетом того, что аминокислотная последовательность SauFDH на С-конце по сравнению с PseFDH короче на 20 остатков, то по сравнению с бактериальным ферментом данные по структуре для SauFDH на 23 остатка меньше. Так как С-концевой участок FDH играет важную роль в связывании субстратов, данные о возможной структуре SauFDH в этой области очень полезны для исследования и инженерии этого фермента. Поэтому для анализа возможных вариантов пространственного положения С-концевого пептида RIASKSYТАК в глобуле фермента из патогена, нами была построена модельная структура SauFDH, содержащая полную последовательность С-конца (рис. 1). На рисунке хорошо видно, что программа добавила небольшую α -спираль на С-конце. Сравнение модельной и экспериментальной структур SauFDH показало высокую точность построенной модели – среднеквадратичное отклонение между ними составило 0,849 Å. Более того, добавление пептида на С-конец привело к тому, что величина RMSD при сравнении структур SauFDH AlphaFold2:PDB:2NAD уменьшилась до 0,510 Å. Таким образом, можно предположить, что результаты предсказаний для белко-

вой инженерии на основе модельной структуры SauFDH имеют высокие достоверность и надежность.

Для выбора аминокислотных замен нами было проведено детальное сравнение трехмерных структур SauFDH (PDB:6TTB и модельная структура) и PseFDH (PDB:2NAC и PDB:2NAD). Результаты сравнения приведены на рис. 2 и в табл. 1. На рис. 2, А показан фрагмент структуры активного центра PseFDH (PDB:2NAD) с изображенными каталитически значимыми остатками His в положениях 223, 259 и 379. Остаток His259 PseFDH образует водородную связь с молекулой NAD^+ . В структурно-эквивалентном положении в SauFDH находится остаток треонина (Thr250) (рис. 2, Б, В и табл. 1), ОН-группа которого располагается на расстоянии 4Å от адениновой части NAD^+ и, вероятно, не образует с ним водородной связи. Для понимания, влияет ли это положение на связывание кофермента и субстрата, было предложено сделать замену T250H в SauFDH.

Анализ структуры холо-формы PseFDH (PDB:2NAD) свидетельствует, что остаток His379, расположенный на С-конце белковой глобулы, и остаток His223 могут взаимодействовать друг с другом по принципу стэкинг-взаимодействия (рис. 2, А) [16]. В SauFDH в структурно-эквивалентных положениях находятся остатки Ile220 (рис. 2, В) и Lys368, которые не взаимодействуют друг с другом. Для образования стэкинг-взаимодействия было решено сделать замены I220H и K368H.

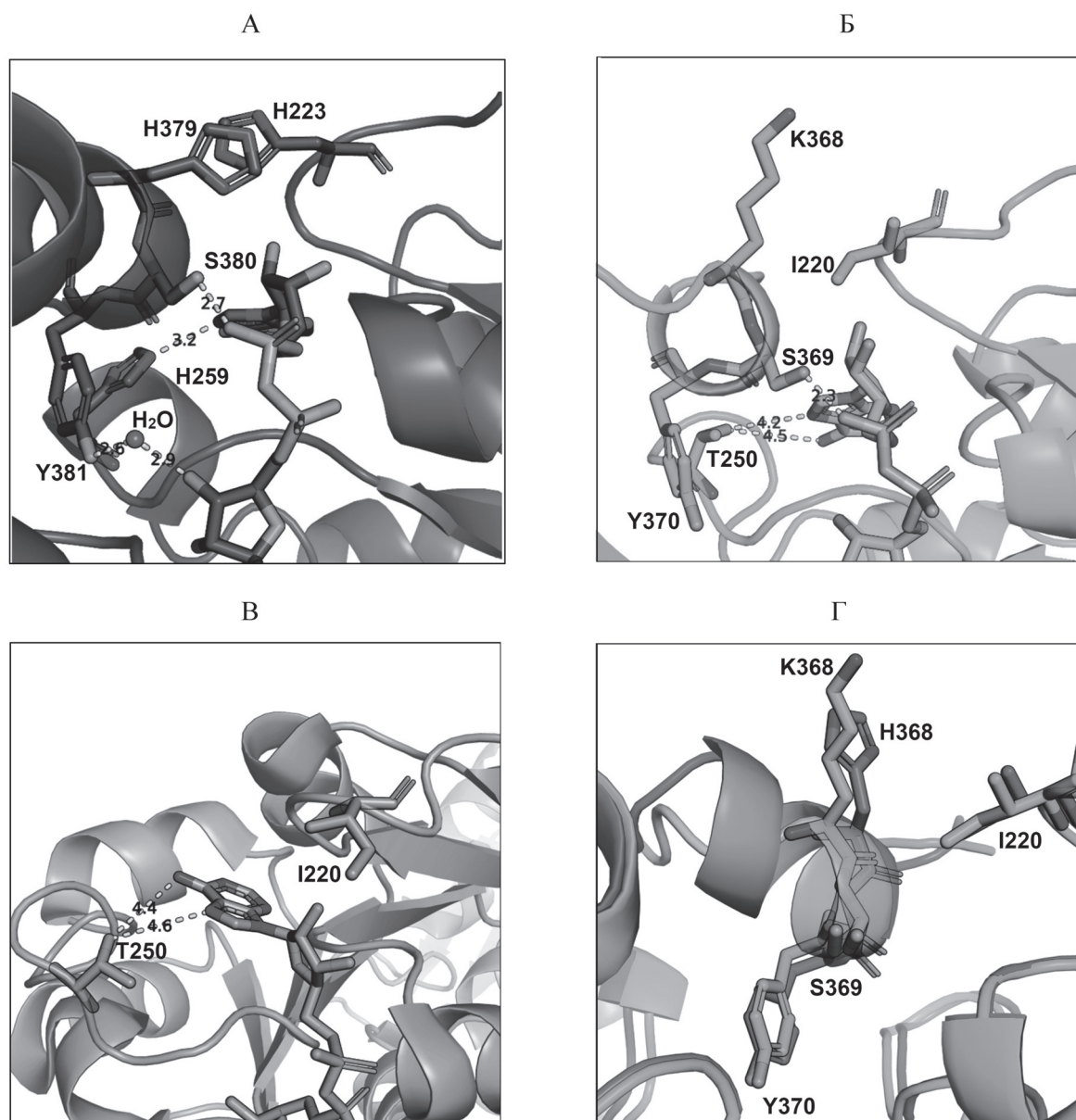


Рис. 2. (А) – активный центр PseFDH (PDB: 2NAD); (Б) – фрагмент модельной структуры SauFDH в области С-концевой последовательности; (В) – фрагмент экспериментальной структуры SauFDH (PDB: 6TTB), RMSD 0,849 Å; (Г) – пространственное наложение смоделированных при помощи AlphaFold2 структур фермента дикого типа и мутантной SauFDH TGA + K368H, RMSD 0,422 Å

Остатки Ser380 и Tyr381 в PseFDH образуют водородные связи с NAD^+ напрямую и через молекулу воды соответственно. В структурно-эквивалентных положениях в SauFDH находятся Ser369 и Thr370 (рис. 2, А, Б). Поэтому в данных положениях было решено замены не делать.

Для выяснения роли С-концевой последовательности SauFDH в катализе нами было проведено множественное выравнивание аминокислотных последовательностей этого фермента из штаммов *Staphylococcus* (рис. 3). Кроме того, в

выравнивание добавлены две последовательности из мезофильных бактерий *Pseudomonas* sp. 101 и *Moraxella* sp. C2 (для них определены структуры апо- и холо-форм, элементы вторичной структуры указаны для PseFDH), а также формилдегидрогеназ из ряда других патогенов (см. подпись к рис. 3). Из рис. 3 следует, что на С-конце в последовательности SauFDH и других FDH из стафилококков имеется делеция из трех аминокислотных остатков. В PseFDH остатки в этом положении являются частью спирали $\alpha 9$,

Т а б л и ц а 1

Взаимодействия, ответственные за связывание кофермента и формирование оптимальной конформации активного центра

Эквивалентные остатки	PseFDH (PDB:2NAD)		SauFDH (PDB:6TTB)		Тип взаимодействия
	H223	H379	I220	–	
	H259	NAD ⁺	T250	–	водородная связь
	F355 и I361	–	F347, F353	–	гидрофобное
	E364	R201/Q34	K356	R198/N143	электростатическое
	H379	H ₂ O	K368	–	водородная связь
	S380	NAD ⁺	S369	–	водородная связь
	Y381	H ₂ O	Y370	–	водородная связь

Т а б л и ц а 2

Каталитические свойства* и активационные параметры процесса термоинактивации SauFDH дикого типа и мутантных форм фермента

Фермент	k_{cat} , с ⁻¹	$K_M^{NAD^+}$, мкМ	$K_M^{HCOO^-}$, мМ	ΔH^\ddagger , кДж/моль	ΔS^\ddagger , Дж/(моль·К)
PseFDH [1]	7,3	65	6,5	540±20	1320±40
wt-SauFDH [8]	20	220±7	130±10	430±20	1010±60
SauFDH I220H	21	330±20	150±10	450±20	1040±50
SauFDH T250H	13	540±50	100±10	590±30	1450±100
SauFDH K368H	6	280±20	105±10	650±50	1630±150
SauFDH TGA + K368H	4	3360±200	420±50	580±30	1415±100
SauFDH AGA + K368H	4	3300±300	230±20	580±20	1410±100
SauFDH I220H + TGA + K368H	4	4980±600	185±20	580±20	1410±80
SauFDH I220H + T250H + TGA + K368H	4	3350±200	300±50	560±20	1420±90

*Представленные значения являются средним из трех независимых экспериментов.

непосредственно контактирующей с молекулой NAD⁺. Вставка трех аминокислотных остатков и замена K368H в SauFDH должна позволить образовать α -спираль на данном участке структуры. Это позволит сформировать активный центр фермента, более похожий на активные центры других FDH. Согласно выравниванию аминокислотных последовательностей, в этой области с наибольшей частотой встречается последовательность из остатков TGA, с несколько меньшей частотой – из остатков AGA. Поэтому было предложено ввести именно эти три аминокислоты для образования дополнительного витка α -спирали. На рис. 2, Г представлен результат на-

ложения структуры мутантной формы со вставкой, смоделированной с помощью AlphaFold2 на модельную структуру FDH дикого типа. Как показано на рис. 2, Г, введение трех дополнительных аминокислотных остатков TGA + замена K368H приводит к незначительному смещению отдельных остатков (I220, H368, S369 и Y381). Однако можно предположить, что остаток Lys368 в модельной структуре фермента дикого типа находится в неструктурированной области, из-за чего эта область может иметь большую подвижность. Предположительно, создание более протяженной α -спирали может привести к стабилизации в пространстве этого фрагмента структуры.

Таким образом, на основании результатов по моделированию структуры SauFDH с полно-размерным С-концом и сравнительного анализа этой структуры со структурой холо-формы PseFDH было предложено сделать точечные замены I220H, T250H, K368H, получить тройной мутант SauFDH с заменами I220H + TGA + K368H, а также получить ферменты с различными комбинациями замен: TGA + K368H, AGA + K368H, I220H + TGA + K368H, I220H + T250H + TGA + K368H.

Получение мутантных SauFDH

SauFDH дикого типа и мутанты экспрессировали в клетках *E. coli* BL21(DE3) CodonPlus/pLysS с выходом 400–500 мг целевого белка на 1 л культуры. Чистота препаратов фермента дикого типа и мутантных SauFDH составила не менее 95%.

Кинетические свойства мутантных SauFDH

Кинетические параметры новых мутантных SauFDH и фермента дикого типа представлены в табл. 2. Введение замены I220H приводило к увеличению $K_M^{NAD^+}$ с 220 до 330 мкМ, $K_M^{HCOO^-}$ с 130 до 150 мМ; значение k_{cat} не изменилось по сравнению со значением для SauFDH дикого типа. При замене T250H наблюдается увеличение $K_M^{NAD^+}$ до 540 мкМ и снижение $K_M^{HCOO^-}$ до 100 мМ; k_{cat} снизился с 20 до 13 с⁻¹. Эти результаты можно объяснить тем, что введение более объемных остатков гистидина может привести к нарушению конформации активного центра. Замена K368H привела к незначительному увеличению $K_M^{NAD^+}$ до 280 мкМ и снижению $K_M^{HCOO^-}$ до 105 мМ, k_{cat} снизилась до 6 с⁻¹. Введение трех дополнительных аминокислот приводит к резкому увеличению $K_M^{NAD^+}$ (примерно до 3300 мкМ для вставок TGA и AGA), вставка TGA приводит к увеличению $K_M^{HCOO^-}$ до 480 мМ, а более гибкая вставка AGA практически не меняет этот параметр. Для обеих мутантных форм k_{cat} уменьшилась до 4 с⁻¹. Аналогичные результаты наблюдались для мутантных форм с заменами I220H + TGA + K368H и I220H + T250H + TGA + K368H. Таким образом, введение вставок на С-конце фермента приводит к увеличению констант Михаэлиса как по коферменту, так и по субстрату, а также к снижению каталитической константы SauFDH.

Температурная стабильность

На рис. 4, А представлены зависимости остаточной активности от времени для новых и ранее

полученных мутантных SauFDH. Зависимости линейны в полулогарифмических координатах, $\ln(A/A_0) - t$, т.е. инактивация мутантных SauFDH, как и фермента дикого типа, соответствует кинетике реакций первого порядка. Константы скорости термоинактивации k_{in} во всех случаях не зависели от концентрации фермента [17]. Это доказывает мономолекулярный механизм инактивации полученных мутантных ферментов. Исследование температурной стабильности проводили в широком диапазоне температур. Замена K368H приводит к стабилизации фермента при 60–64 °С. Вероятно, происходит образование новой связи. Введение вставок TGA и AGA вместе с заменой K368H привело к незначительному изменению температурной стабильности. Замены I220H, T250H приводят к снижению температурной стабильности примерно в 1,5–2 раза. Возможным объяснением этого может быть нарушение системы водородных связей и электростатических взаимодействий в белковой глобуле в области расположения этих остатков. Процесс инактивации может быть описан с помощью теории активированного комплекса; поэтому для расчета активационных параметров процесса термоинактивации всех изученных ферментов использовали основное уравнение этой теории в линейной форме:

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

где $\text{const} = \ln(k_B/h) + (\Delta S^\ddagger/R)h$ – постоянная Планка, k_B – константа Больцмана, ΔH^\ddagger и ΔS^\ddagger – энтальпия и энтропия активации соответственно, R – универсальная газовая постоянная.

Зависимость константы скорости инактивации от температуры в координатах $\ln(k_{in}/T) - 1/T$ представляет собой прямую линию с наклоном, равным $\Delta H^\ddagger/R$. На рис. 4, Б представлены температурные зависимости наблюдаемой константы скорости термоинактивации для всех полученных мутантных форм и фермента дикого типа в координатах $\ln(k_{in}/T) - 1/T$. С применением теории активированного комплекса были рассчитаны значения энтальпии (ΔH^\ddagger) и энтропии (ΔS^\ddagger) активации, представленные в табл. 2.

Высокие значения активационных параметров могут свидетельствовать о том, что процессы термоинактивации фермента обусловлены разворачиванием белковой глобулы. Особо следует отметить, что по сравнению с ферментом дикого типа мутантные SauFDH имеют гораздо более высокие значения ΔH^\ddagger . Это означает, что у мутантных ферментов константа скорости

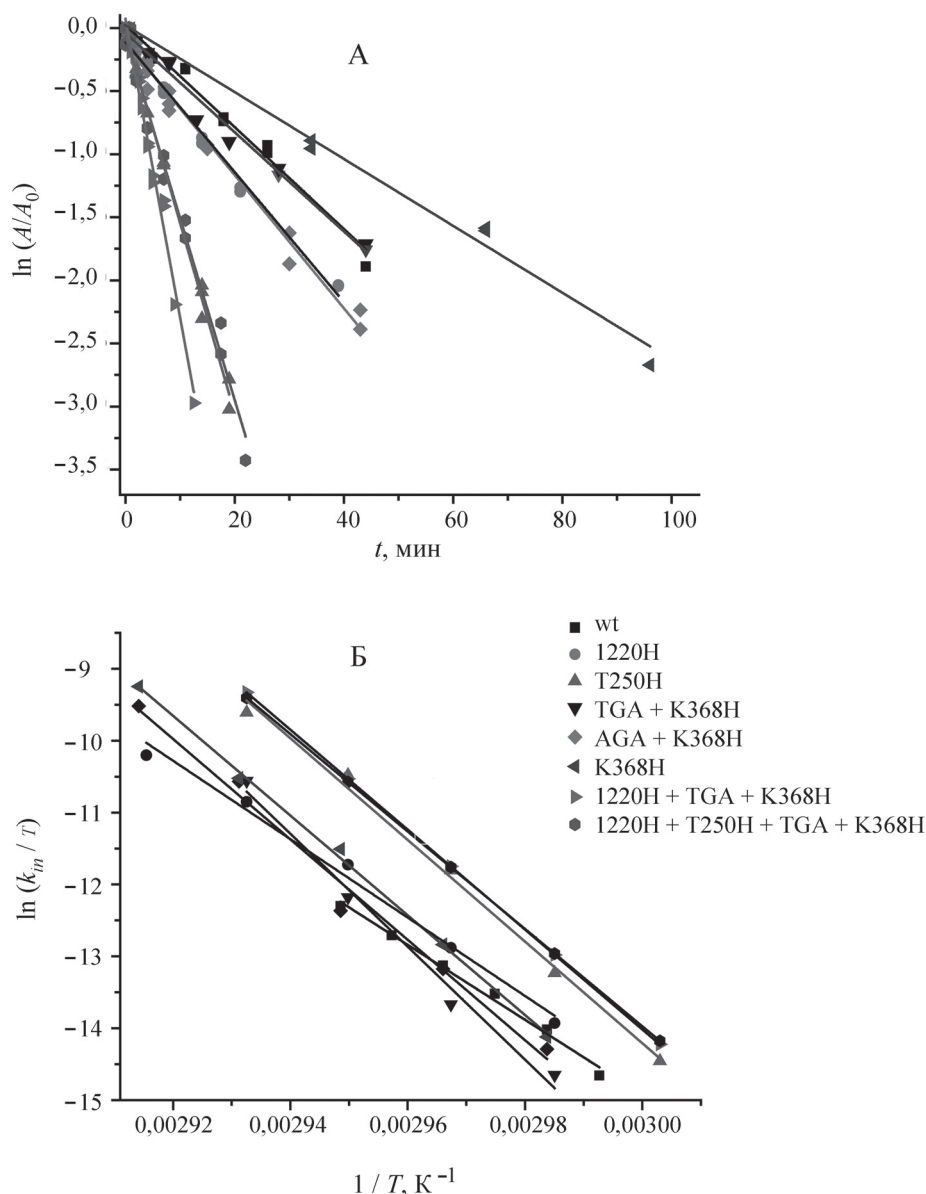


Рис. 4. А – зависимость остаточной активности от времени инкубации в полулогарифмических координатах для SauFDH дикого типа (wt) и ее мутантных форм при 64 °С, 0,1 М NaPB, 0,01 М NaЭДТА, pH 7,0; Б – зависимости констант скорости термоинактивации для SauFDH дикого типа (wt) и ее мутантных форм от температуры в координатах $[\ln(k_{in}/T)] - 1/T$ для фермента дикого типа и мутанта

термоинактивации при снижении температуры уменьшается гораздо больше, чем у фермента дикого типа. На основании полученных параметров активации были рассчитаны значения констант скорости термоинактивации в интервале температур от 4 до 80 °С, их сравнили с показателями для ферментов дикого типа (табл. 3). Из данных таблицы следует, что при комнатной температуре мутантные SauFDH превосходят по термостабильности фермент дикого типа на несколько порядков. Наиболее заметный эффект стабилизации при низких значениях температуры

наблюдается для SauFDH K368H, TGA + K368H и AGA + K368H. На основании результатов компьютерного моделирования можно предположить, что это связано с формированием более компактной конформации активного центра в области С-концевой последовательности после введения замены.

Обсуждение результатов

Поскольку введение трех дополнительных аминокислотных остатков не привело к существенному изменению температурной ста-

Эффект стабилизации мутантных форм по сравнению с ферментом дикого типа*

T, °C	Эффект стабилизации для мутантных SauFDH									
	I220H	T250H	K368H	TGA+K368H	AGA+K368H	I220H+TGA+K368H	I220H+T250H+TGA+K368H			
4	1,50E+03	2,30E+07	1,37E+10	4,41E+07	2,76E+07	8,96E+06	2,83E+06			
20	1,41E+02	8,82E+04	1,13E+07	2,02E+05	1,32E+05	4,30E+04	1,94E+04			
25	7,11E+01	1,75E+04	1,43E+06	4,22E+04	2,78E+04	9,11E+03	4,56E+03			
30	3,66E+01	3,68E+03	1,95E+05	9,29E+03	6,20E+03	2,03E+03	1,13E+03			
35	1,92E+01	8,10E+02	2,83E+04	2,15E+03	1,45E+03	4,76E+02	2,90E+02			
40	1,03E+01	1,88E+02	4,37E+03	5,21E+02	3,55E+02	1,17E+02	7,83E+01			
50	3,15E+00	1,15E+01	1,24E+02	3,49E+01	2,42E+01	8,01E+00	6,42E+00			
60	1,03E+00	8,35E-01	4,35E+00	2,75E+00	1,95E+00	6,45E-01	6,12E-01			
61	9,28E-01	6,48E-01	3,15E+00	2,15E+00	1,52E+00	5,05E-01	4,88E-01			
62	8,34E-01	5,03E-01	2,10E+00	1,68E+00	1,20E+00	3,97E-01	3,89E-01			
63	7,49E-01	3,92E-01	1,66E+00	1,32E+00	9,40E-01	3,12E-01	3,11E-01			
64	6,74E-01	3,05E-01	1,67E+00	1,04E+00	7,40E-01	2,45E-01	2,49E-01			
65	6,07E-01	2,38E-01	8,78E-01	8,16E-01	5,83E-01	1,94E-01	1,99E-01			
66	5,46E-01	1,86E-01	7,93E-01	6,43E-01	4,60E-01	1,53E-01	1,60E-01			
68	4,44E-01	1,14E-01	3,28E-01	4,01E-01	2,88E-01	9,56E-02	1,03E-01			
70	3,62E-01	7,06E-02	1,86E-01	2,51E-01	1,81E-01	6,02E-02	6,70E-02			
75	2,19E-01	2,16E-02	4,11E-02	8,00E-02	5,81E-02	1,93E-02	2,32E-02			
80	1,34E-01	6,86E-03	9,47E-03	2,63E-02	1,92E-02	6,42E-03	8,30E-03			

*Эффект стабилизации рассчитывался как отношение констант скорости инактивации SauFDH дикого типа к константе скорости инактивации мутантного фермента при данной температуре, k_m^{wt}/k_m^{mut} . Полулогичным шрифтом выделены величины эффекта стабилизации, рассчитанные из экспериментальных данных.

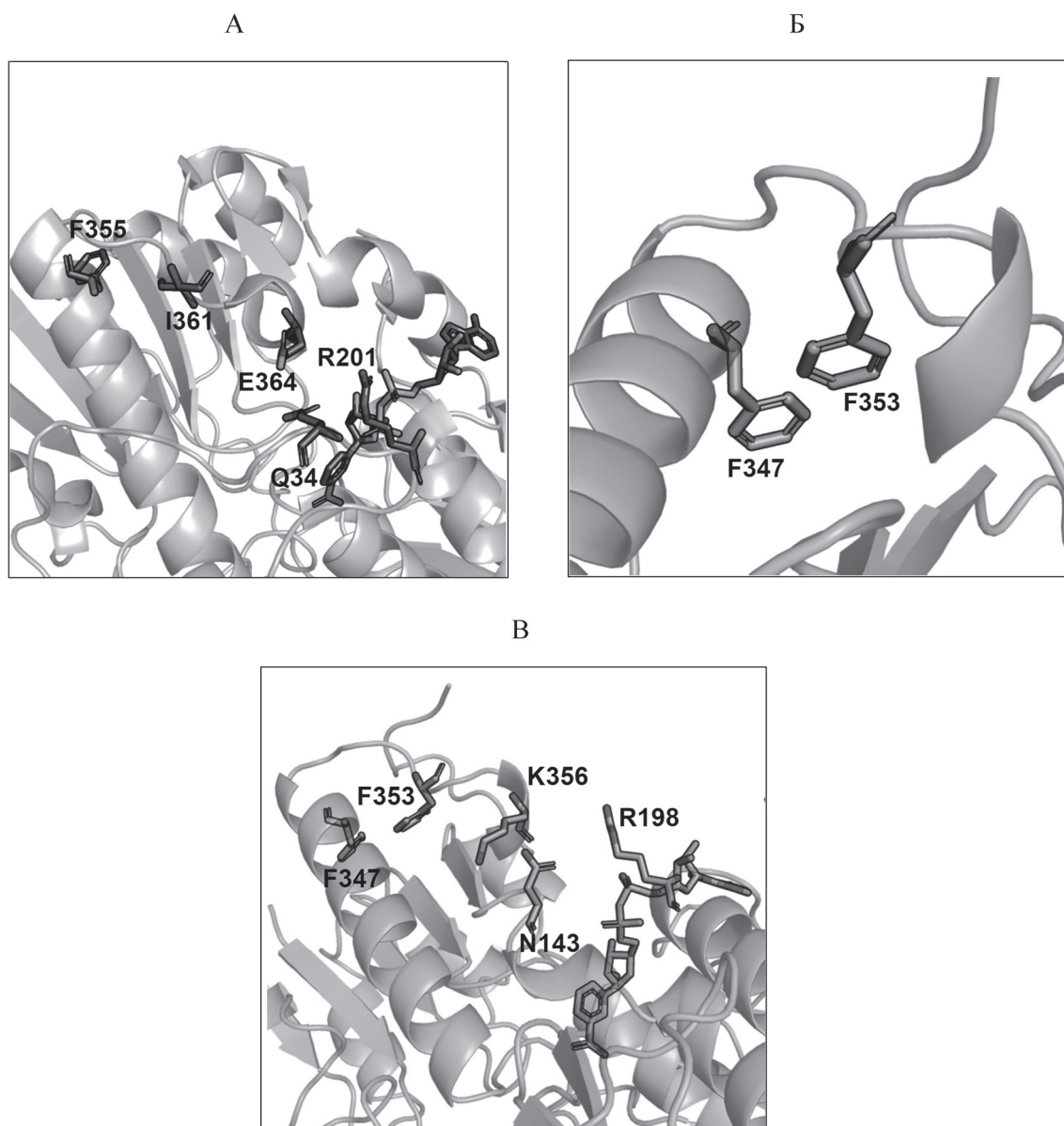


Рис. 5 (А) Структура С-концевой области PseFDH; (Б) два больших по объему остатка фенилаланина в С-концевой области SauFDH; (В) – Структура С-концевой области SauFDH

бильности в области температур 60–70 °С, сопровождающееся критическим ухудшением каталитических свойств, было выдвинуто предположение, что введение дополнительного витка α -спирали приводит к закрытию входа в активный центр. Иными словами, изменение носит локальный характер и не затрагивает белковую глобулу в целом. Дальнейший анализ С-концевой последовательности и сопоставление структур PseFDH и SauFDH позволили выявить ряд отличий в непосредственной близости к каталитически значимым С-концевым остаткам, описанным ранее. В табл. 1 представлены структурно-эквивалентные положения с типом

их взаимодействия. В структуре SauFDH обнаружено присутствие двух больших по объему остатков F347 на конце спирали α -8 и F353 в неструктурированной области (рис. 5, Б). Примечательно, что в структурно-эквивалентных положениях PseFDH (табл. 1 и рис. 5, А) имеется меньший по объему остаток I361. Предположительно, наличие двух объемных остатков фенилаланина может приводить к увеличению объема активного центра. Этим можно также объяснить подобную инертность структуры активного центра к введению дополнительных элементов вторичной структуры. Присутствие двух объемных остатков Phe значимо также потому, что эта об-

ласть структуры у SauFDH содержит важный остаток K356, расположенный напротив одноименно заряженного остатка R198 (рис. 5, Б), который находится в высококонсервативном мотиве GXGXXG [18]. Это может приводить к взаимному отталкиванию одноименных зарядов и увеличению объема активного центра. Вместо положительно заряженного остатка K356 в структурно эквивалентном положении PseFDH расположен остаток E364, противоположно заряженный относительно высококонсервативного R201. Таким образом, это электростатическое взаимодействие (притяжение) может играть важную роль в формировании оптимальной конформации активного центра, а также косвенно способствовать вовлечению С-концевой области в связывание кофермента у PseFDH.

Выводы

Результаты проведенных экспериментов свидетельствуют, что С-концевая аминокислотная последовательность играет важную роль в формировании оптимальной конформации активного центра.

Нами получены новые мутантные формы с заменами I220H и T250H в активном центре SauFDH. За счет введения этих замен, вероятно, происходит увеличение объема области активного центра SauFDH. Значения $K_M^{NAD^+}$ для этих мутантных форм увеличились в 1,5 и 2,5 раза соответственно, тогда как величины $K_M^{HCOO^-}$ и k_{cat} изменились незначительно. Таким образом, увеличение объема области активного центра приводит к ослаблению связывания NAD^+ .

Согласно выравниванию, аминокислотные последовательности FDH большинства бактерий имеют удлиненный С-конец, тогда как для семейства стафилококков характерна укороченная последовательность. Увеличение длины α -спирали с помощью вставок TGA или AGA на С-конце приводило к резкому увеличению констант Михаэлиса как для NAD^+ , так и для $HCOO^-$, а также к критическому снижению k_{cat} . Предположительно, это может быть связано с закрытием входа в активный центр, поскольку, несмотря на явное снижение каталитической эффективности, изменения температурной стабильности не происходит. Иными словами, отсутствуют значительные изменения основной части белковой глобулы. Можно сделать вывод, что дополнительная α -спираль и остаток гистидина действительно играют ключевую роль в формировании оптимальной конформации активного центра. Однако в случае FDH из *S. aureus* этот эффект имеет негативные последствия для каталитических свойств. Следовательно, проблема объемного активного центра в С-концевой области не может быть решена с помощью одних лишь точечных замен, приводящих к улучшению связывания кофермента. Требуется комплексный подход, включающий в себя исследование влияния стерических эффектов, гидрофобных, стэкинг- и электростатических взаимодействий между отдельными элементами вторичной структуры, задействованными в формировании активного центра. Однако этот подход отличается меньшей предсказуемостью и для его осуществления требуется детальное исследование структуры белка и учет многих факторов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tishkov V.I., Popov V.O. // Biochemistry (Moscow). 2004. Vol. 69. N 11. P. 1252–1267 (DOI: 10.1007/s10541-005-0071-x).
2. Tishkov V.I., Popov V.O. // Biomol. Eng. 2006. Vol. 23. P. 89–110 (DOI: 10.1016/j.bioeng.2006.02.003).
3. Alekseeva A.A., Savin S.S., Tishkov V.I. // Acta Naturae. 2011. Vol. 3. N 4. P. 38–54 (DOI: 10.32607/20758251-2011-3-4-38-54).
4. Resch A., Rosenstein R., Nerz C., Götz F. // Appl. Environ. Microbiol. 2005. Vol. 71. N 5. P. 2663–2676.
5. Tishkov V.I., Goncharenko K.V., Alekseeva A.A., Kleymenov S.Yu., Savin S.S. // Biochemistry (Moscow). 2015. Vol. 80. N 13. P. 1690–1700 (DOI:10.1134/S000629791513005).
6. Ernst M., Kaup B., Müller M., Bringer-Meyer S., Sahm H. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2005. Vol. 66. N 6. P. 629–634.
7. Weckbecker A., Gröger H., Hummel W. // Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 2010. Vol. 120. P. 195–242.
8. Liu Q., Zhou J., Yang T., Zhang X., Xu M., Rao Z. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2018. Vol. 102. N 5. P. 2129–2141.
9. Tishkov V.I., Pometun A.A., Stepashkina A.V., Fedorchuk V.V., Zarubina S.A., Kargov I.S., Atroshenko D.L., Parshin P.D., Shelomov M.D., Kovalovski R.P., Boiko K.M., Eldarov M.A., D’Oronzo E., Facheris S., Secundo F., Savin S.S. // Moscow Univ. Chem. Bull. 2018. Vol. 73. N 1. P. 1–6 (DOI: 10.3103/S0027131418020153).
10. Pometun A.A., Boyko K.M., Yurchenko T.S., Nikolaeva A.Y., Kargov I.S., Atroshenko D.L., Savin S.S., Popov V.O., Tishkov, V.I. // Biochemistry (Moscow). 2020. Vol. 85. N 6. P. 689–696 (DOI: 10.1134/S0006297920060061).

11. Jumper J., Evans R., Pritzel A., Green T., Figurnov M., Ronneberger O., Tunyasuvunakool K., Bates R., Žídek A., Potapenko A., Bridgland A., Meyer C., Kohl S. A. A., Ballard A. J., Cowie A., Romera-Paredes B., Nikolov S., Jain R., Adler J., Back T., Petersen S., Reiman D., Clancy E., Zielinski M., Steinegger M., Pacholska M., Berghammer T., Bodenstein S., Silver D., Vinyals O., Senior A. W., Kavukcuoglu K., Kohli P., Hassabis D. // *Nature*. 2021. Vol. 596. N 7873. P. 583–589.
12. Mirdita M., Schütze K., Moriwaki Y., Heo L., Ovchinnikov S., Steinegger M. // *Nature Methods*. 2022. Vol. 19. N 6. P. 679–682.
13. Emsley P., Lohkamp B., Scott W. G., Cowtan K. // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 2010. Vol. 66. N 4. P. 486–501.
14. Alekseeva A.A., Savin S.S., Kleimenov S.Y., Uporov I.V., Pometun E.V., Tishkov V.I. // *Biochemistry (Moscow)*. 2012. Vol. 77. N 10. P. 1199–1209 (DOI: 10.1134/S0006297912100124).
15. Bradford M.M. A // *Anal. Biochem.* 1976. Vol. 72. P. 248–254.
16. Fogal S., Beneventi E., Cendron L., Bergantino E. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2015. Vol. 99. N 22. P. 9541–9554.
17. Sadykhov E.G. Serov A.E., Voinova N.S., Uglanova S.V., Petrov A.S., Alekseeva A.A., Kleimenov S.Y., Popov V.O., Tishkov V.I. // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2006. Vol. 42. N 3. P. 236–240 (DOI: 10.1134/S0003683806030021).
18. Baker P.J., Britton K.L., Rice D.W., Rob A., Stillman T.J. // *J. Mol. Biol.* 1992. Vol. 228. P. 662–671 (DOI: 10.1016/0022-2836(92)90848-e).

Информация об авторах

Юрченко Татьяна Сергеевна – аспирант химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (yurchenko.ts.chem@gmail.com);

Логинова Анастасия Аркадьевна – аспирант химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (anastasiia.loginova@chemistry.msu.ru);

Сергеев Егор Павлович – студент химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (egor.sergeev001@yandex.ru);

Пометун Евгений Владимирович – доцент кафедры аналитической, физической и коллоидной химии Института фармации ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), канд. хим. наук (epometun@gmail.com);

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» Российской академии наук; докт. хим. наук, профессор (vitishkov@gmail.com);

Савин Святослав Сергеевич – ст. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, канд. биол. наук (savinslava@gmail.com);

Пометун Анастасия Александровна – ст. науч. сотр. лаборатории молекулярной инженерии Института биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, ст. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, доктор химических наук (aapometun@gmail.com).

Вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила в редакцию 05.09.2022;
одобрена после рецензирования 12.10.2022;
принята к публикации 14.10.2022.