

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

УДК 577.322.24

**ВЫСОКОСТАБИЛЬНАЯ МУТАНТНАЯ БАКТЕРИАЛЬНАЯ  
ФОРМИАТДЕГИДРОГЕНАЗА С УЛУЧШЕННЫМИ  
КАТАЛИТИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ**

Анастасия Александровна Пометун<sup>1</sup>, Анна Андреевна Широкова<sup>2</sup>, Наталия Павловна Галаничева<sup>3</sup>, Леонид Александрович Шапошников<sup>4</sup>, Денис Леонидович Атрошенко<sup>5</sup>, Евгений Владимирович Пометун<sup>6</sup>, Владимир Иванович Тишков<sup>7</sup>, Святослав Сергеевич Савин<sup>8</sup>

<sup>1, 4, 5, 7</sup> Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук  
<sup>1-3, 5, 7, 8</sup> Химический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова

<sup>6</sup> ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет)

**Авторы, ответственные за переписку:** Анастасия Александровна Пометун, aapometun@gmail.com; Владимир Иванович Тишков, vitishkov@gmail.com

**Аннотация.** NAD<sup>+</sup>-зависимая формиадегидрогеназа (ФДГ, КФ 1.2.1.2) метилотрофных бактерий *Pseudomonas* sp. 101 (PseFDH) имеет одно из самых высоких значений термостабильности среди всех известных ферментов этой группы. Введение в PseFDH ряда аминокислотных замен позволило получить многоточечный мутантный фермент PseFDH SM4S с еще более высокой температурной и химической стабильностью. Ранее нами было показано, что введение в PseFDH SM4S дополнительных отдельных точечных замен S131A, или S160A, или E170D приводит к еще большей стабилизации фермента. В настоящей работе на основе мутанта PseFDH SM4S S131A получены новые мутантные ФДГ, в которых по сравнению с PseFDH SM4S дополнительно введены двойная, тройная и четверная замены S131A/E170D (M2), S131A/S160A/E170D (M3) и S131A/S160A/E170D/S145A (PseFDH SM4A M3). Новые мутантные PseFDH были суперэкспрессированы в клетках *E. coli*, очищены и охарактеризованы. Замены S131A/E170D и S131A/S160A/E170D обеспечивают дальнейшее повышение термостабильности. Введение замены S145A в PseFDH SM4S M3 приводит к значительному снижению  $K_M^{NAD^+}$  и  $K_M^{HCOO^-}$  при сохранении каталитической константы на прежнем уровне. Эта мутантная форма может быть успешно использована в системах регенерации NADH, а также для детекции NAD<sup>+</sup> и формиага в биологических системах.

**Ключевые слова:** формиадегидрогеназа, *Pseudomonas* sp. 101, каталитические свойства, температурная стабильность, сайт-направленный мутагенез

DOI: 10.55959/MSU0579-9384-2-2023-64-2-99-111

**Список сокращений:** ФДГ – формиадегидрогеназа; PseFDH SM4S M2, PseFDH SM4S M3 и PseFDH SM4A M3 – мутантные PseFDH SM4S с двойной S131A/E170D, тройной S131A/E170D/S160A и четверной S131A/E170D/S160A/S145A заменами соответственно.

**Финансирование.** Работа выполнена 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.

© Пометун А.А., Широкова А.А., Галаничева Н.П., Шапошников Л.А., Атрошенко Д.Л., Пометун Е.В., Тишков В.И., Савин С.С., 2023

**Для цитирования:** Пометун А.А., Широкова А.А., Галаничева Н.П., Шапошников Л.А., Атрошенко Д.Л., Пометун Е.В., Тишков В.И., Савин С.С. Высокостабильная мутантная бактериальная форматдегидрогеназа с улучшенными каталитическими свойствами // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. Т. 64. № 2. С. 99–111.

ORIGINAL ARTICLE

## HIGHLY STABLE MUTANT BACTERIAL FORMAT DEHYDROGENASE WITH IMPROVED CATALYTIC PROPERTIES

Anastasia A. Pometun<sup>1</sup>, Anna A. Shirokova<sup>2</sup>, Natalia P. Galanicheva<sup>3</sup>, Leonid A. Shaposhnikov<sup>4</sup>, Denis L. Atroshenko<sup>5</sup>, Evgenii V. Pometun<sup>6</sup>, Vladimir I. Tishkov<sup>7</sup>, Svyatoslav S. Savin<sup>8</sup>

<sup>1, 4, 5, 7, 8</sup> Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Centre “Fundamentals of Biotechnology” of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

<sup>1-3, 5, 7</sup> Department of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

<sup>6</sup> Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation

**Corresponding author:** Anastasia A. Pometun, aapometun@gmail.com, Vladimir I. Tishkov, vitishkov@gmail.com

**Abstract.** NAD<sup>+</sup>-dependent formate dehydrogenase (FDH, EC 1.2.1.2) from methylotrophic bacterium *Pseudomonas* sp.101 (PseFDH) has one of the highest thermal stability among all known enzymes of this group. The introduction of a number of amino acid substitutions into PseFDH made it possible to obtain a multipoint mutant PseFDH SM4S enzyme with even higher temperature and chemical stability. Previously, we showed that the introduction of additional single point replacements S131A, or S160A, or E170D into PseFDH SM4S led to further stabilization of the enzyme. In this work, based on the PseFDH SM4S S131A mutant, new mutant FDHs obtained, in which, compared to PseFDH SM4S, we added double S131A/E170D (M2), triple S131A/S160A/E170D (M3) and quadruple S131A/S160A/ E170D/S145A (PseFDH SM4A M3) amino acids replacements. The new PseFDH mutants were overexpressed in *E. coli* cells, purified and characterized. The S131A/E170D and S131A/S160A/E170D changes provided further improving thermal stability. The introduction of the S145A substitution into PseFDH SM4S M4 leads to a significant decrease in  $K_M^{\text{NAD}^+}$  and  $K_M^{\text{HCOO}^-}$  while maintaining the catalytic constant at the same level. This mutant form can be successfully used in NADH regeneration systems, as well as for the detection of NAD<sup>+</sup> and formate in biological systems.

**Keywords:** formate dehydrogenase, *Pseudomonas* sp.101, catalytic properties, thermal stability, site-directed mutagenesis

**Abbreviations:** FDH – formate dehydrogenase; PseFDH SM4S M2, PseFDH SM4S M3, and PseFDH SM4A M3 are mutant PseFDH SM4S with double S131A/E170D, triple S131A/E170D/S160A, and quadruple S131A/E170D/S160A/S145A substitutions, respectively

**Financial Support.** This work was partly supported by the grant of the President of the Russian Federation for state support of young Russian scientists – doctors of science (contract – MD-2021) MD-349.2021.1.4 and partly within the framework of the state task.

**For citation:** Pometun A.A., Shirokova A.A., Galanicheva N.P., Shaposhnikov L.A., Atroshenko D.L., Pometun E.V., Tishkov V.I., Savin S.S. Highly Stable Mutant Bacterial Format Dehydrogenase with Improved Catalytic Properties // Vestn. Mosk. un-ta. Ser. 2. Chemistry. T. 64. № 2. P. 99–111.

NAD<sup>+</sup>-зависимая формиатдегидрогеназа (ФДГ, КФ 1.2.1.2.) из метилотрофных бактерий *Pseudomonas* sp. 101 (PseFDH) активно изучается с начала 70-х годов прошлого века. В 1977 г. этот фермент был получен в очищенном виде, затем были изучены его основные свойства [1]. PseFDH – первая бактериальная формиатдегидрогеназа, ген которой был клонирован и успешно экспрессирован в клетках *E. coli* [2, 3]. Несмотря на то, что за последние пятьдесят с лишним лет было описано много новых ФДГ из различных источников, PseFDH до сих остается ферментом с самой высокой термостабильностью среди ферментов этой группы [4]. Кроме того, как и большинство бактериальных формиатдегидрогеназ, PseFDH имеет более высокую каталитическую константу по сравнению с ФДГ из эукариот [5, 6]. Для PseFDH получен целый ряд пространственных структур как в свободной форме (2NAC, 2GO1), так и в комплексе с NAD<sup>+</sup> и формиатом (2NAD, 2GUG).

В нашей лаборатории для PseFDH и формиатдегидрогеназ из других источников проводятся систематические исследования по изучению взаимосвязи структура-функция, а также работы по улучшению свойств методом рационального дизайна [5–7]. Проведены эксперименты, позволяющие определить ключевые аминокислотные остатки для катализа и строения субстратного канала [8–10]. Сделаны аминокислотные замены (отдельные и многоточечные), в результате которых была улучшена химическая [11–13] и температурная стабильность PseFDH [14–16]. PseFDH является также первой формиатдегидрогеназой, у которой была изменена коферментная специфичность с NAD<sup>+</sup> к NADP<sup>+</sup> [17, 18]. Получены мутантные формы с измененной изоэлектрической точкой [19]. Методом направленного мутагенеза исследовано влияние His-tag на N-конце аминокислотной последовательности на свойства PseFDH и NADP<sup>+</sup>-специфичных мутантов [20]. Для PseFDH проведены также эксперименты по увеличению химической стабильности. Получены мутантные формы, обладающие высокой устойчивостью в присутствии пероксида водорода [21].

На основе PseFDH с измененной коферментной специфичностью нами в совместной работе с немецкими коллегами были получены и охарактеризованы гибридные белки, состоящие из PseFDH и монооксигеназы цитохром P450 BM3. Оказалось, что такие фьюжн-системы превосходят по своим свойствам смеси отдельных ферментов [22].

Ранее в нашей лаборатории была получена мутантная PseFDH SM4S, в которой основными были три мутации. Замены Cys145Ser и Cys255Ala привели к повышению на несколько порядков химической стабильности [21], а за счет замены Ala198Gly была более чем в два раза улучшена термостабильность и снижены константы Михаэлиса по обоим субстратам [15]. На следующем этапе в мутантную PseFDH SM4S были введены точечные замены S131A, S160A и E170D, которые демонстрировали положительный стабилизирующий эффект на ферменте дикого типа [16]. Все три замены и в случае PseFDH SM4S приводили к увеличению термостабильности фермента. В рамках настоящей работы мы поэтапно объединили эти три стабилизирующие замены в одном ферменте, используя в качестве исходного варианта PseFDH SM4S S131A, полученную ранее [16]. В конечный вариант была введена замена Ser145Ala, которая, по нашему предположению, за счет гидрофобизации активного центра должна была увеличить эффективность связывания как формиата, так и никотинамидной группы кофермента.

## Материалы и методы

### Проведение реакции направленного мутагенеза

Введение точечных замен проводили с помощью двустадийной полимеразной цепной реакции (ПЦР). В качестве матриц использовали плазмиды с мутантными генами pPseFDH8 SM4S S131A, pPseFDH8 SM4S S131A E170D, pPseFDH8 SM4S S131A E170D S160A, в которых ген *psefdh* находится под контролем сильного промотора РНК-полимеразы фага T7. Для введения мутаций использовали прямой (Psenew\_for) и обратный (Psenew\_Rev) праймеры на начало и конец гена соответственно, а также прямой и обратный праймеры, несущие требуемую замену в гене *psefdhsm4*.

Последовательности праймеров приведены ниже:

Psenew\_for 5'-GATATACATATGGCAAAG  
GTCTTGTGCGTTCTTTAC-3'

Psenew\_rev 5'-GAGCTCGAATTCTCAGAC  
CGCCTTCTTGAAC-3'

S160A for 5'-GATGATCCTGGCGCTGGT  
GCGCAACTATCTGCCCTC-3'

S160A rev 5'-GCACCAGCGCCAGGATCA  
TCATCACCACATG-3'

E170D for 5'-CCTCGCACGATTGGGCGC  
GGAAGGGCGGCTG-3'

E170D rev 5'-CTTCCGCGCCCAATCGTG  
CGAGGGCAGATAGTTGCGCAC-3'

S145A for 5'-GTCACCTACGCGAACTCG  
ATCAGCGTCG-3'

S145A rev 5'-CCTTCAGTGGATGCGCTT  
GAGCTAGTCG-3'

Реакционная смесь для проведения ПЦР содержала 2,5 мкл 10-кратного буфера для *Pfu* ДНК-полимеразы (200 мМ Tris-HCl (pH 8,8 при 25 °C), 100 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 100 мМ KCl, 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 добавляли 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, а затем проводили реакцию по следующей программе: денатурация – 95 °C, 30 с; связывание праймеров – 54–58 °C, 60 с; удлинение цепи – 72 °C, 2 мин, всего 25–35 циклов. После последнего цикла реакционную смесь дополнительно выдерживали 5 мин при 72 °C. Температуру на второй стадии выбирали на 3–5 градусов ниже температуры плавления дуплексов (T<sub>m</sub>), образуемых праймерами.

Для получения фрагментов, содержащих требуемую замену, проводили две ПЦР с использованием следующих пар праймеров:

1) прямого праймера PseFor, содержащего необходимую нуклеотидную(ые) замену(ы) и обратного праймера Psenew\_rev (фрагмент 1);

2) стандартного прямого праймера Psenew\_for и обратного праймера PseRev, также содержащего необходимую нуклеотидную(ые) замену(ы) (фрагмент 2).

Продукты двух ПЦР очищали с помощью электрофореза в 1%-м агарозном геле с последующим выделением из него фрагментов ДНК. На следующем этапе проводили третью (объединяющую) ПЦР с праймерами Psenew\_for и Psenew\_rev, где в качестве ДНК матрицы использовали оба полученных ранее фрагмента. Продукт объединяющей ПЦР очищали аналогично и затем обрабатывали эндонуклеазами рестрикции NdeI и EcoRI. Этими же рестриктазами обрабатывали плазмиду, используемую в

качестве матрицы для удаления из нее фрагмента гена, в который вводилась мутация. Обработанный рестриктазами продукт ПЦР и плазмиду очищали с помощью электрофореза и проводили лигирование. Полученной после реакции лигирования смесью трансформировали клетки *E. coli* DH5α. Для контроля введения требуемых мутаций проводили секвенирование 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*

Экспрессию PseFDH дикого типа и ее мутантов проводили 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). Далее клетки инкубировали в течение 12 ч при 37 °C. 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 пересевали 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 проводили индукцию клеток, 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 (мас.). Полученную суспензию замораживали и хранили при –20 °C.



### **Выделение и очистка**

Клетки после культивирования разрушали на ультразвуковом дезинтеграторе. Далее клеточный дебрис осаждали центрифугированием («Eppendorf 5804 R», 40 мин, +4 °С, 12 000 об/мин), а к полученному бесклеточному экстракту добавляли насыщенный раствор сульфата аммония (конечная концентрация 35% от насыщения) в 0,1 М натрий-фосфатном буфере, 0,01М ЭДТА, рН 7,0 (раствор А) и оставляли на 4–8 ч при +4 °С. Нерастворившиеся белки осаждали на центрифуге «Eppendorf 5804 R» в стаканах объемом 50 мл (11 000 об/мин, +4 °С), а полученный супернатант наносили на колонку 1,0×10 см с высокозамещенной *Phenyl Sepharose FastFlow* («Pharmacia Biotech», Австрия), уравновешенной раствором А. После нанесения 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, 0,01М ЭДТА, рН 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  $A_{260}$ ), а также ферментативную активность ( $A$ ) и отбирали фракции с максимальным соотношением ( $A/A_{280}$ ). Обессоливание проводили на колонке 2,5×10 см (объем 25 мл) с Sephadex G25 Fine («Pharmacia Fine Chemicals», Швеция), уравновешенной буфером 0,1 М Na-фосфат, 0,01М ЭДТА, рН 7,0. Собирали фракции по 0,5 мл, для каждой фракции определяли ферментативную активность и поглощение на 280 нм. Контроль чистоты полученных препаратов осуществляли с помощью аналитического электрофореза в 12%-м полиакриламидном геле в присутствии 0,1%-го додецилсульфата натрия на приборе для электрофореза «MiniProtean II» фирмы «BioRad», согласно протоколу фирмы-производителя. Концентрацию фермента в пробах рассчитывали по величине поглощения 1,6 для 0,1%-го раствора очищенной PseFDH на длине волны 280 нм.

### **Измерение активности формиатдегидрогеназы**

Активность ФДГ определяли спектрофотометрически по накоплению NADH на длине волны 340 нм ( $\epsilon_{340} = 6220 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) на спектрофотометре «Schimadzu UV1800 PC» при 30 °С в 0,1 М натрий-фосфатном буфере (рН 7,0). Концентрация формиата натрия и  $\text{NAD}^+$  в кювете составляла 0,6 М и 1 мг/мл соответственно.

### **Определение констант Михаэлиса**

Константы Михаэлиса по  $\text{NAD}^+$  и формиату определяли по зависимостям активности фермента от концентрации ( $0,4\text{--}6 K_M$ ) соответствующего субстрата. Концентрация второго субстрата была насыщающей ( $>15 K_M$ ). Точную концентрацию исходного раствора  $\text{NAD}^+$  определяли спектрофотометрически на длине волны 260 нм ( $\epsilon_{260} = 17800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ). Раствор формиата натрия с заданной концентрацией готовили, растворяя нужное количество субстрата в 0,1 М натрий-фосфатном буфере (рН 7,0). Объем раствора доводили до метки в мерной колбе. Значения  $K_M$  были рассчитаны по экспериментальным зависимостям методом нелинейной регрессии с помощью программы Origin Pro 8.5.

### **Изучение кинетики термоинактивации**

Термостабильность ферментов измеряли в 0,1 М натрий-фосфатном буфере (рН 7,0) при нескольких значениях температуры. Для каждого эксперимента готовили серию из пластиковых пробирок объемом 0,5 мл по 100 мкл раствора фермента (0,2 мг/мл) в каждой. Пробирки помещали в предварительно прогретый до необходимой температуры водный термостат (точность термостатирования составляла  $\pm 0,1$  °С). В определенные моменты времени отбирали по одной пробирке и переносили в лед на 5 мин, после чего пробирку центрифугировали в течение 3 мин при 12 000 об/мин на центрифуге «Eppendorf 5415D». Остаточную активность ФДГ измеряли, как описано выше. Каждое измерение активности проводили по три раза. Константу скорости термоинактивации  $k_{in}$  определяли как тангенс угла наклона прямой из графика зависимости натурального логарифма величины остаточной активности от времени (полулогарифмические координаты  $\ln(A/A_0) - t$ ) методом линейной регрессии, используя программу Origin Pro 8.5.

### **Результаты и их Обсуждение**

#### **Выбор остатков для направленного мутагенеза**

В предыдущей нашей работе [13] по улучшению свойств PseFDH были получены мутантные формы PseFDH SM4S K61P; PseFDH SM4S E170D; PseFDH SM4S K61R; PseFDH SM4S S131A; PseFDH SM4S S160A, из которых замена E170D привела к самому существенному увеличению температурной стабильности.

Поскольку единичные замены S131A и S160A также приводят к увеличению термостабильности PseFDH дикого типа [11], было принято решение объединить замены путем добавления их к мутанту PseFDH SM4S S131A в целях дальнейшего увеличения стабильности. Также было принято решение сделать замену S145A, поскольку этот остаток локализован в активном центре (рис. 1) и, вероятно, увеличение гидрофобности в этой части активного центра может положительно влиять на связывание кофермента и субстрата. В результате были получены три новых мутантных формы PseFDH: SM4S S131A/E170D (M2), SM4S S131A/E170D/S160A (M3) и SM4S S131A/E170D/S160A/S145A. Последняя форма получила обозначение PseFDH: SM4A M3. Изменение аббревиатуры SM4S на SM4A связано с тем, что у PseFDH дикого типа в 145 положении находится остаток Cys. Как уже отмечалось ранее, для повышения химической стабильности фермента была введена замена Cys145Ser. Последняя буква «S» в конце аббревиатуры SM4S обозначает наличие в мутантной PseFDH остатка Ser в 145 положении. Поскольку в этой работе остаток Ser145 был заменен на остаток Ala, то для преемственности обозначений мутантных PseFDH аббревиатура SM4S была изменена на SM4A.

#### **Получение мутантных форм PseFDH**

Новые мутантные PseFDH были получены согласно методике, приведенной в соответствующем разделе экспериментальной части. Результаты секвенирования показали, что в целевых генах содержатся только запланированные нуклеотидные замены. Для контроля

параллельно проводили экспрессию исходной PseFDH SM4S и фермента дикого типа. Полученные данные позволяют сделать вывод, что используемая нами методика экспрессии PseFDH дикого типа подходит и для получения новых мутантных форм. Выделение и очистку мутантных PseFDH проводили по стандартной методике, разработанной в нашей лаборатории ранее [14]. На рис. 2, где представлены результаты аналитического электрофореза полученных препаратов мутантных форм PseFDH, показано, что для каждого препарата имеется лишь одна полоса, что свидетельствует об отсутствии примесей. Таким образом, чистота полученных препаратов ферментов составляет не менее 99%.

#### **Кинетические свойства полученных мутантных ферментов**

В табл. 1 представлены данные по кинетическим параметрам мутантных ферментов. Видно, что значение каталитической константы при введении замен практически не меняется. Константа  $K_M^{\text{HCOO}^-}$  максимальна для мутантной формы PseFDH SM4S M3 и имеет значение, в 1,5 раза превышающее таковое для wt-PseFDH. При этом введение в 145 положении PseFDH SM4S M3 замены Ser145Ala снижает этот параметр до 1,2 мМ. Что касается  $K_M^{\text{NAD}^+}$ , добавление мутаций последовательно снижает этот параметр. Так, для мутантной формы PseFDH SM4S M2  $K_M^{\text{NAD}^+}$  составляет 34,5 мкМ, добавление замены S160A снижает  $K_M^{\text{NAD}^+}$  до 30 мкМ, а введение в 145 положении замены Ser145Ala делает этот параметр еще ниже – 22,6 мкМ. Таким образом, введе-

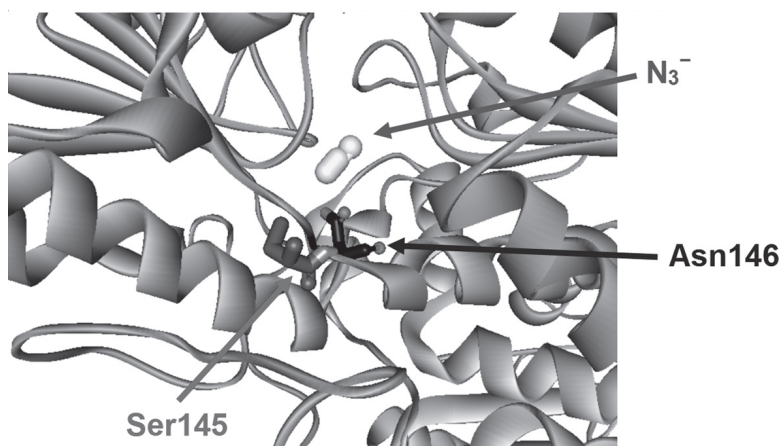


Рис. 1. Моделирование замены остатка Ser на остаток Ala в 145 положении

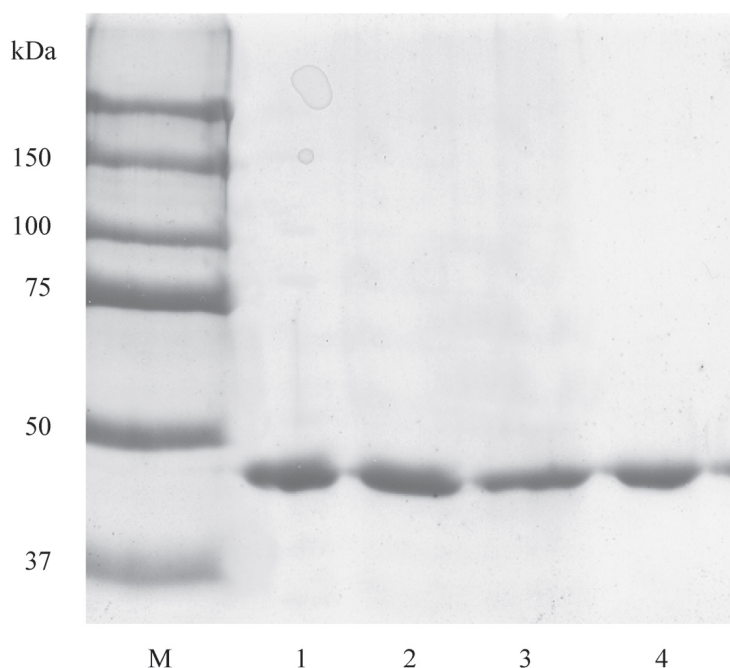


Рис. 2. Аналитический SDS-На электрофорез в 12%-м полиакриламидном геле препаратов PseFDH после гель-фильтрации (M – маркер молекулярной массы; 1 – PseFDH SM4S/S131A/E170D/S160A/S145A; 2 – PseFDH SM4S/S131A/E170D/S160A; 3 – PseFDH SM4S/S131A/E170D; 4 – PseFDH SM4S)

Т а б л и ц а 1

**Кинетические параметры мутантных PseFDH и фермента дикого типа\***

Фермент	$k_{cat}$ , $c^{-1}$	$K_M^{HCOO^-}$ , мМ	$K_M^{NAD^+}$ , мМ	$k_{cat}/K_M^{HCOO^-}$ , $(M^{-1}c^{-1}) \cdot 10^3$	$k_{cat}/K_M^{NAD^+}$ , $(M^{-1}c^{-1}) \cdot 10^6$
wt-PseFDH	7,3±0,3	1,63±0,08	52,5±2,5	4,47	0,14
PseFDH SM4S	7,3±0,3	1,36±0,14	35,5±1,5	5,37	0,21
PseFDH SM4S S131A [13]	7,5±0,4	2,31±0,15	48,6±1,6	3,25	0,15
PseFDH SM4S E170D [13]	7,3±0,3	1,11±0,08	41,0±1,7	6,58	0,18
PseFDH SM4S S160A [13]	7,3±0,3	1,22±0,12	48,6±2,7	5,98	0,15
PseFDH SM4S M2	7,6±0,2	2,10±0,30	34,5±3,5	3,62	0,22
PseFDH SM4S M3	7,4±0,4	2,5±0,4	30,0±1,6	2,96	0,25
PseFDH SM4A M3	7,6±0,1	1,2±0,1	22,6±1,7	6,33	0,34

\*0,1 М Натрий-фосфатный буфер, 0,01М ЭДТА (pH 7,0; 30 °С).

ние мутаций приводит к получению многоочечной мутантной формы PseFDH SM4A M3, у которой  $K_M^{HCOO^-}$  и  $K_M^{NAD^+}$  снижены в 1,4 и 2,3 раза соответственно при сохранении  $k_{cat}$  примерно на прежнем уровне. Каталитическая эффективность для формиата и  $NAD^+$  соответственно увеличилась в 1,4 и 2,4.

**Температурная стабильность мутантных форм PseFDH**

Термостабильность полученных мутантных PseFDH изучали в температурном диапазоне 65–69 °С, когда термоинактивация фермента дикого типа протекает необратимо по мономолекулярному механизму в соответствии с кинети-

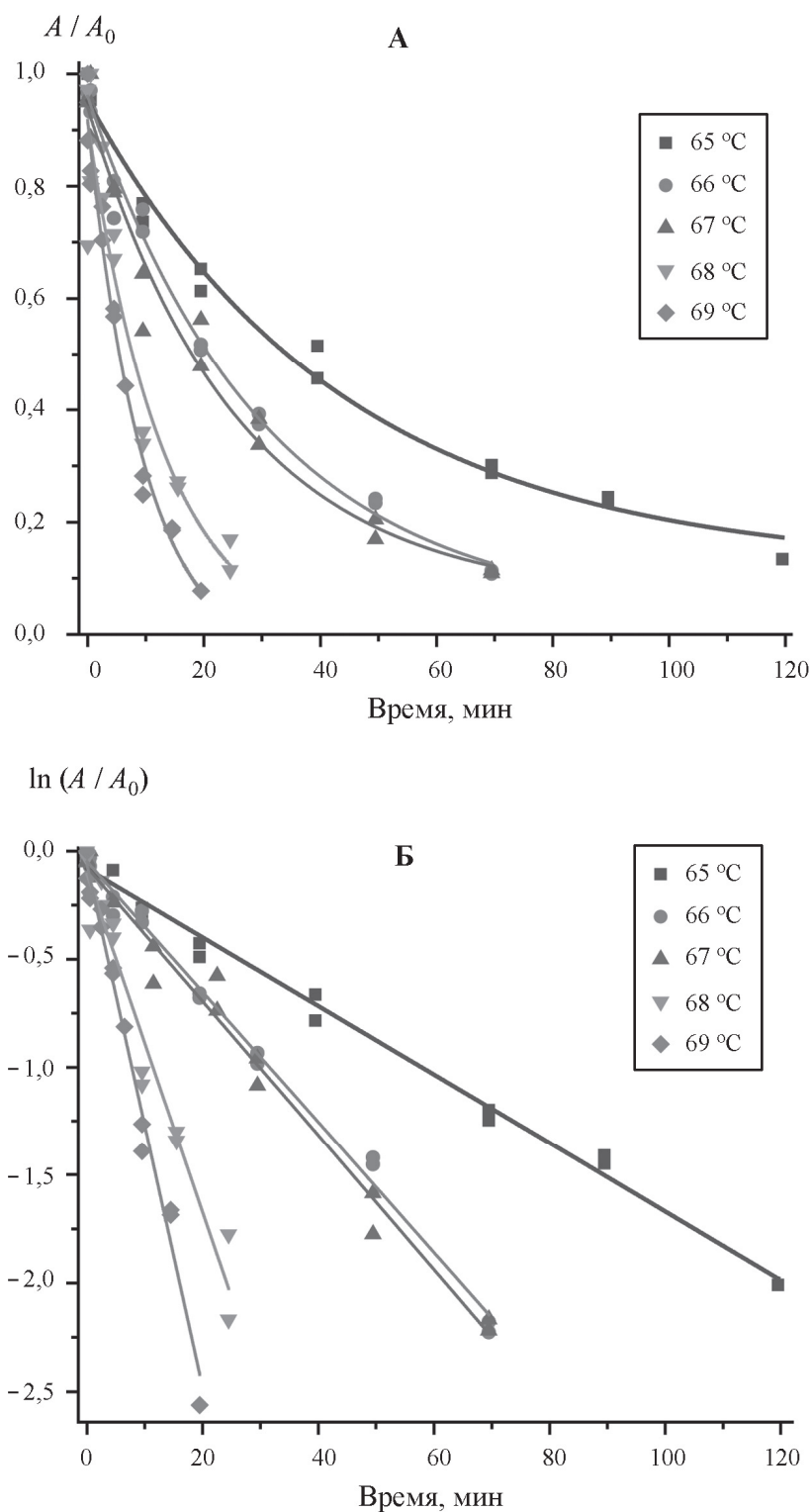


Рис. 3. Зависимости остаточной активности мутантной PseFDH SM4S с дополнительными заменами S131A, E170D, S160A и S145A (PseFDH SM4A M3) от времени в координатах  $A/A_0 - t$  (А) и  $\ln(A/A_0) - t$  (Б) при температуре 65–69 °C (0,1 М натрий-фосфатный буфер, pH 7,0)

кой реакций первого порядка. На рис. 3, А, Б в качестве примера представлены зависимости остаточной активности мутантной PseFDH SM4A M3 от времени в обычных и в полуло-

гарифмических координатах соответственно. Видно, что наблюдаемые зависимости представляют собой простые экспоненты и хорошо линейризуются в полулогарифмических коор-



динах, т.е. процесс инактивации протекает в соответствии с кинетикой реакций первого порядка. По тангенсу угла наклона прямых рассчитывали наблюдаемую константу скорости термоинактивации  $k_{in}$  первого порядка.

В табл. 2 представлены значения эффекта стабилизации для всех мутантных форм по сравнению с ферментом дикого типа wt-PseFDH и мутантной формой PseFDH SM4S. Из табл. 2 видно, что максимальный эффект стабилизации достигается для мутанта PseFDH SM4S M3. Замена остатка Ser на остаток Ala в 145 положении приводит к снижению температурной стабильности мутантной формы, но все же стабильность мутанта PseFDH SM4S M4 в 1,9–3,6 раз выше, чем у фермента дикого типа.

Нами был проведен анализ зависимости наблюдаемой константы скорости термоинактивации от температуры. Истинно мономолекулярный характер процесса инактивации всех форм PseFDH во всем исследуемом температурном диапазоне позволяет применить теорию активированного комплекса (ТАК) для анализа этого процесса.

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  $k_B = 1,238 \cdot 10^{-23}$  Дж/К – постоянная Больцмана,  $h = 6,634 \cdot 10^{-34}$  Дж·с – постоянная Планка,  $R = 8,314$  Дж/моль/К – универсальная газовая постоянная.

Это уравнение можно представить в линейной форме:

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

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

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. На рис. 4 показано, что во всех случаях харак-

тер зависимости  $k_{in}$  примерно такой же, как и для исходной PseFDH SM4S. С помощью ТАК были 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:

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

Для нахождения энергии активации было использовано следующее выражение:

$$\Delta G^\ddagger = RT \left[ \ln\left(\frac{k_B}{h}\right) - \ln\left(\frac{k_{in}}{T}\right) \right] = RT \ln\left(\frac{k_B T}{k_{in} h}\right).$$

Из табл. 3 видно, что для более стабильных мутантных форм и исходной PseFDH SM4S значения  $\Delta H^\ddagger$  и  $\Delta S^\ddagger$  примерно одинаковы и достоверно выше, чем таковые для фермента дикого типа. Замена Ser/Ala в 145 положении приводит к тому, что значения активационных параметров возвращаются к значениям для фермента дикого типа.

Результаты нашей работы подтвердили важность остатка в положении 145 для проявления высокой каталитической эффективности PseFDH. Как уже отмечалось выше, в PseFDH дикого типа в положении 145 находится остаток Cys. Этот остаток расположен рядом с остатком Asn146, который, согласно данным рентгеноструктурного анализа, наряду с остатком Gln313 играет ключевую роль в связывании формиат-иона в активном центре фермента [8]. Естественно, окисление или химическая модификация Cys145 приводила к изменению конформации активного центра и инактивации PseFDH. У большинства бактериальных формиатдегидрогеназ в этом положении находится остаток Ser [5, 6], поэтому в PseFDH была сделана замена Cys145Ser. Такая замена увеличила химическую стабильность фермента и не повлияла на температурную. Кроме того, как следует из табл. 1, замена Cys145Ser привела также к уменьшению констант Михаэлиса по обоим субстратам. Особенно это заметно в случае  $K_M$  по  $\text{NAD}^+$ . Дальнейшая гидрофобизация активного центра в районе остатка 145 при замене Ser145Ala также дала положительный эффект. Как следует из табл. 1, мутантная PseFDH SM4A M3 обладает по сравнению с PseFDH более высокой каталитической эффективностью с  $\text{NAD}^+$  и формиатом (в 1,4 и 2,4 раза соответственно). В отличие от замены Cys145Ser введение в положение 145 остатка Ala приводит к снижению

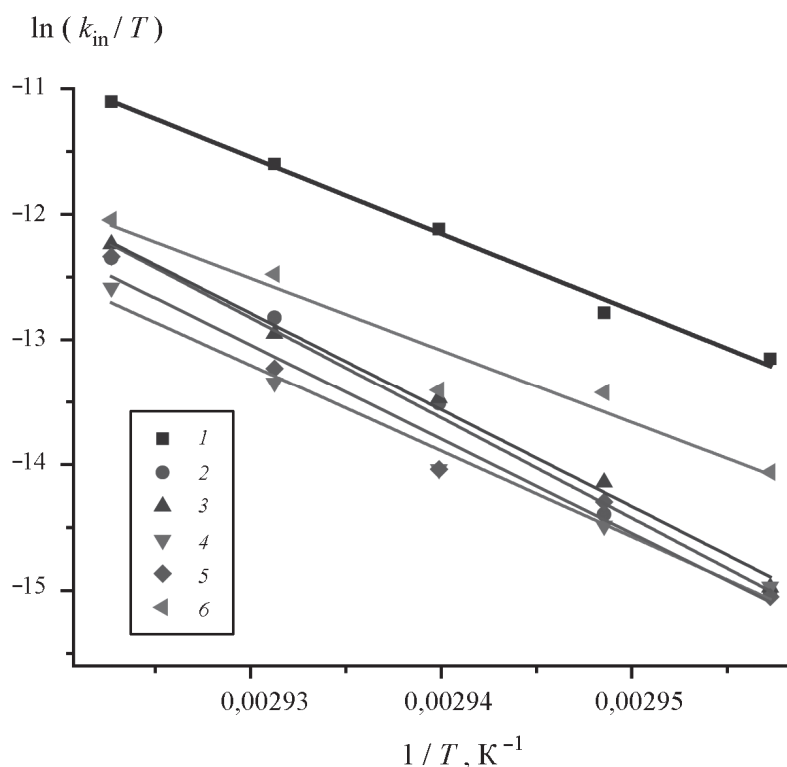


Рис. 4. Зависимость констант скорости термоинактивации мутантных форм PseFDH от температуры в координатах  $\ln(k_{in}/T) - 1/T$  (0,1 М натрий-фосфатный буфер, pH 7,0): 1 – PseFDHwt, 2 – PseFDHSM4S, 3 – PseFDHSM4S/S131A, 4 – PseFDHSM4S/S131A/E170D, 5 – PseFDHSM4S/S131A/E170D/S160A, 6 – PseFDHSM4S/S131A/E170D/S160A/S145A

Т а б л и ц а 2

**Значения эффекта стабилизации\* мутантных ферментов по отношению к PseFDH дикого типа и PseFDH SM4S при разной температуре**

Фермент	Эффект стабилизации, $k_{in}^{wt}/k_{in}^{mut}$ ( $k_{in}^{SM4S}/k_{in}^{mut}$ )				
	температура, °C				
	65	66	67	68	69
wt-PseFDH	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 S131A [13]	7,39(1,05)	4,13(0,93)	4,50(0,93)	4,20(1,15)	2,90(0,83)
PseFDH SM4S E170D [13]	12,40(1,76)	7,95(1,41)	6,85(1,42)	5,40(1,49)	4,70(1,35)
PseFDH SM4S S160A [13]	6,35(0,90)	4,13(0,93)	4,30(0,90)	3,10(0,95)	2,81(0,81)
PseFDH SM4S M2	6,70(1,03)	4,50(0,90)	6,80(1,69)	5,10(1,50)	3,40(0,99)
PseFDH SM4S M3	6,20(0,95)	5,50(1,10)	6,80(1,69)	5,70(1,68)	4,40(1,27)
PseFDH SM4A M3	2,50(0,38)	1,90(0,38)	3,60(0,90)	2,40(0,71)	2,60(0,74)

\*Эффект стабилизации рассчитан как отношение наблюдаемой константы скорости термоинактивации мутантного 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 (0,01М ЭДТА; pH 7,0).

Т а б л и ц а 3

**Активационные параметры процесса термоинактивации мутантных форм PseFDH 0,1 М натрий-фосфатный буфер (рН 7,0)**

Фермент	Параметр	
	$\Delta H^\ddagger$ , кДж/моль	$\Delta S^\ddagger$ , Дж/(моль·К)
wt-PseFDH	470 ± 20	1100 ± 100
PseFDH SM4S	650 ± 40	1600 ± 100
PseFDH SM4S S131A [13]	630 ± 50	1720 ± 100
PseFDH SM4S E170D [13]	700 ± 30	1730±100
PseFDH SM4S S160A [13]	690 ± 35	1550±100
PseFDH SM4S M2	620 ± 35	1520 ± 150
PseFDH SM4S M3	560 ± 40	1360 ± 140
PseFDH SM4A M3	470 ± 15	1100 ± 70

температурной стабильности по сравнению с PseFDH SM4S. Частично эта потеря термостабильности была компенсирована тремя заменами S131A/S160A/E170D. В результате стабильность мутантной PseFDH SM4A M3 при повышенной температуре более, чем в два раза превышает стабильность фермента дикого типа. Такого запаса термостабильности вполне достаточно для использования стадии термообработки бесклеточного экстракта при выделении фермента. Эта стадия повышает чистоту фермента с 40 до 80% и более [6], что во многих случаях позволяет получить биокатализатор без стадии хроматографии. Благодаря улучшенным кинетическим параметрам полученная мутантная форма PseFDH SM4A M3 может быть успешно использована в системах регенерации NADH, а также для детекции NAD<sup>+</sup> в биологических жидкостях.

температурной стабильности по сравнению с PseFDH SM4S. Частично эта потеря термостабильности была компенсирована тремя заменами S131A/S160A/E170D. В результате стабильность мутантной PseFDH SM4A M3 при повышенной температуре более, чем в два раза превышает стабильность фермента дикого типа. Такого запаса термостабильности вполне достаточно для использования стадии термообработки бесклеточного экстракта при выделении фермента. Эта стадия повышает чистоту фермента с 40 до 80% и более [6], что во многих случаях позволяет получить биокатализатор без стадии хроматографии. Благодаря улучшенным кинетическим параметрам полученная мутантная форма PseFDH SM4A M3 может быть успешно использована в системах регенерации NADH, а также для детекции NAD<sup>+</sup> в биологических жидкостях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Rodionov Y.V., Avilova T.V., Zakharova E.V., Platonenkova L.S., Egorov A.M., Berezin I.V. // *Biochemistry (Moscow)*. 1977. Vol. 42. N 10. P. 1497–1504.
- Tishkov V.I., Galkin A.G., Egorov A.M. // *Dokl. USSR Acad.Sci.* 1991. Vol. 37. N 3. P. 745–748. PMID: 1954846
- Tishkov V.I., Galkin A.G., Marchenko G.N., Tsygankov Y.D., Egorov A.M. // *Biotechnol. Appl. Biochem.* 1993. Vol. 18. P. 201–207.
- 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. Vol. 73. N. 2. P. 80–84.
- Tishkov V.I., Popov V.O. // *Biochemistry (Moscow)*. 2004. Vol. 69. N 11. P. 1252–1267. doi: 10.1007/s10541-005-0071-x.
- Tishkov V.I., Popov V.O. // *Biomol. Eng.* 2006. Vol. 23. N 2–3. P. 89–110 (DOI: 10.1016/j.bioeng.2006.02.003).
- Alekseeva A.A., Savin S.S., Tishkov V.I. // *Acta Naturae*. 2011. Vol. 3. N 4 (11). P. 38–54 (DOI: 10.32607/20758251-2011-3-4-38-54).
- 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. Vol. 390. N 1, P. 104–108 (DOI: 10.1016/0014-5793(96)00641-2).
- 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. Vol. 1594. N 1. P. 136–149.
- Popinako A.V., Pometun A.A., Nilov D.K., Dibrova D.V., Khrustalev V.V., Khrustaleva T.A., Iurchenko T.S., Nikolaeva A.Yu, Švedas V.K., Boyko K.M., Tishkov V.I., Popov V.O. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2022. Vol. 616, P. 134–139 (DOI: 10.1016/j.bbrc.2022.05.064).
- Tishkov V.I., Galkin A.G., Egorova O.A., Marchenko G.N., Tsygankov Y.D., Egorov, A.M. // *Dokl. USSR Acad. Sci.* 1993. Vol. 328. N 3. P. 407–410.
- Tishkov V.I., Galkin A.G., Marchenko G.N., Egorova O.A., Shelukho D.V., Kulakova L.B., Dementieva L.A., Egorov A.M. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1993. Vol. 192. N 2. P. 976–981 (DOI: 10.1006/bbrc.1993.1511).
- Odintseva E.R., Popova A.S., Rojkova A.M., Tishkov V.I. // *Vestn. Mosk. un-ta. Ser. 2. Chemistry.* 2002. Vol. 43. N 6. P. 356–359 (Rus).

14. Rojkova A.M., Galkin A.G., Kulakova L.B., Serov A.E., Savitsky P.A., Fedorchuk V.V., Tishkov V.I. // FEBS Lett. 1999. Vol. 445. N 1. P. 183–188.
15. 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.
16. Pometun A.A., Parshin P.D., Galanicheva N.P., Shaposhnikov L.A., Atroshenko D.L., Pometun E.V., Burmakin V.V., Kleymenov S.Yu., Savin S.S., Tishkov V.I. // Acta Naturae. 2022. Vol. 14. N 1 (52). P. 82–91 (DOI: 10.32607/actanaturae.11665).
17. Seelbach K., Riebel B., Hummel W., Kula M.-R., Tishkov V.I., Egorov A.M., Wandrey C., Kragl U. // Tetrahedron Lett. 1996. Vol. 37. N 9. P. 1377–1380.
18. Alekseeva A.A., Fedorchuk V.V., Zarubina S.A., Sadykhov E.G., Matorin A.D., Savin S.S., Tishkov V.I. // Acta Naturae. 2015. Vol. 7. N 1 (24). P. 60–69.
19. Alekseeva A.A., Petrov A.S., Fedorchuk V.V., Fedorchuk E.A., Osipova T.A., Tishkov V.I. // Moscow Univ Chem Bull. 2014. Vol. 69. N 2. P. 73–79.
20. 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. Vol. 75. N 4. P. 250–257.
21. Savin S.S., Tishkov V.I. // Acta Naturae. 2010. Vol. 2. N 1 (4). P. 97–101 (DOI: 10.32607/20758251-2010-2-1-97-101).
22. Kokorin A., Parshin P.D., Bakkes P.J., Pometun A.A., Tishkov V.I., Urlacher V.B. // Scientific reports. 2021. Vol. 11. Paper 21706 (DOI: 10.1038/s41598-021-00957-5).

### Информация об авторах

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, докт. хим. наук (aapometun@gmail.com);

Широкова Анна Андреевна – студентка химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (annaevashirokova@gmail.com);

Галаничева Наталия Павловна – студентка химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (gnatalia0@gmail.com);

Шапошников Леонид Александрович – аспирант кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова;

Атрошенко Денис Леонидович – мл. науч. сотр. лаборатории молекулярной инженерии Института биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, канд. хим. наук (atrdenis@gmail.com);

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).

### Вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.



### **Конфликт интересов**

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила в редакцию 05.11.2022;  
одобрена после рецензирования 12.11.2022;  
принята к публикации 24.11.2022.