

УДК 577.322.63

ВЛИЯНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ HIS₆ НА СВОЙСТВА ФОРМИАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ИЗ БАКТЕРИЙ *PSEUDOMONAS* SP. 101

А.А. Пометун^{1,2,3}, П.Д. Паршин^{2,3}, Н.П. Галаничева², И.В. Упоров²,
Д.Л. Атрошенко^{1,2,3}, С.С. Савин^{2,3}, В.И. Тишков^{1,2,3*}

(¹ Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН; ² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет; ³ ООО «Инновации и высокие технологии МГУ»; *e-mail: vitishkov@gmail.com)

NAD(P)⁺-зависимая формиатдегидрогеназа (ФДГ, КФ 1.2.1.2.) активно используется в процессах хирального синтеза с участием оксидоредуктаз для регенерации восстановленного кофактора. Для успешного использования ФДГ в таких системах необходим простой и быстрый способ очистки фермента. В качестве такого способа широко используется металло-хелатная хроматография, для которой необходимо наличие нескольких (шести и более) остатков гистидина на N- или C-конце аминокислотной последовательности фермента. Зачастую такое добавление остатков гистидина оказывает влияние на свойства ферментов. Проведено моделирование структур ФДГ из бактерий *Pseudomonas* (PseFDH) с разным положением гистидиновой метки. Показано, что наиболее оптимально вводить последовательность His₆ на N-конец, а не на C-конец фермента. Методом направленного мутагенеза получены His₆-PseФДГ дикого типа и два NADP⁺-специфичных мутанта. Новые ферменты выделены в одну стадию практически в гомогенном состоянии. Сравнение их свойств с таковыми для исходных ферментов показало, что введение His-tag не влияет на каталитические свойства и слабо сказывается на термостабильности NADP⁺-специфичных мутантов.

Ключевые слова: формиатдегидрогеназа, *Pseudomonas* sp.101, аффинная хроматография, каталитические свойства, температурная стабильность, His-tag.

Введение в последовательность белка дополнительного полипептидного фрагмента (аффинных тегов) позволяет легко очищать белки как из эукариотических, так и из прокариотических организмов [1]. Этот подход активно используется для научных исследований и практического применения разных ферментов. Кроме того, добавление полипептидных тегов может улучшать растворимость белков, решать проблемы фолдинга и повышать уровень экспрессии [2].

Один из наиболее широко используемых подходов – введение на N- или C-конец белка последовательности из шести остатков гистидина (His₆-tag), хотя можно использовать и более длинные последовательности, например His_{7–12} [3]. His₆ используют для проведения очистки рекомбинантных белков методом аффинной металло-хелатной хроматографии [1]. Отметим, что His₆ не проявляет иммуногенности, в отличие от многих других полипептидных тегов.

Сродство His₆ к Cu²⁺, Ni²⁺, Co²⁺ или Zn²⁺ позволяет быстро с чистотой до 99% отделить по-

лученный комплекс металла и белка с His₆ от массы других бактериальных белков. Процедура очистки включает связывание фермента с His-tag на металло-хелатном носителе и отмывку носителя от несвязавшихся белков. С помощью буферных растворов, имеющих низкую концентрацию имидазола, с колонки снимали белки, имеющие низкое сродство. Для элюирования целевого белка с колонки использовали более высокие концентрации имидазола.

Введение His₆ существенно упрощает процесс очистки белка. В то же время физико-химические свойства таких белков могут отличаться от свойств белков без His₆. В качестве примера можно привести ФДГ из термотолерантных дрожжей *Ogataea parapolymorpha* DL-1 (OraFDH). В работе [4] был получен рекомбинантный фермент с His₆ на C-конце (OraФДГ-C-His₆). В нашей лаборатории была создана генно-инженерная конструкция, позволяющая получать OraFDH дикого типа без аффинной метки [5]. Оказалось, что введение His-tag на C-конец

OpaFDH приводит к увеличению константы Михаэлиса по NAD^+ в семь раз (84 и 12 мкМ для OpaFDH-C-His₆ и wt-OpaFDH соответственно). Подобные исследования были проведены для ФДГ из *Candida methylica* (CmeFDH). В работе [6] показано, что после присоединения His₆ на N-конец константа Михаэлиса фермента по формиау имеет такое же значение, что и для CmeFDH дикого типа. Авторы [7] исследовали влияние расположения His₆ на растворимость и каталитические свойства рекомбинантной формиатдегидрогеназы из *Chaetomium thermophilum* (CthFDH). Показано, что His₆ не влияет на растворимость ферментов, однако CthFDH с гистибиновой меткой на C-конце аминокислотной последовательности обладает почти в три раза более высокой удельной активностью и в два раза большей каталитической эффективностью по сравнению с ферментом, содержащим His₆ на N-конце.

Из приведенных выше данных следует, что даже в случае такого консервативного фермента, как формиатдегидрогеназа, нельзя точно предсказать эффект влияния введения His₆ на свойства фермента. В настоящей работе проведено моделирование структуры ФДГ из бактерий *Pseudomonas* sp.101 (PseFDH) с His-tag на N- и C-конце аминокислотной последовательности фермента. Получены три типа PseFDH с His₆ на N-конце, изучены их каталитические свойства и термостабильность.

Экспериментальная часть

Компьютерное моделирование. Ручной докинг фрагментов белковых структур и моделирование структур по гомологии были выполнены с помощью пакета программ Discovery Studio 2019 (Accelrys, Inc., <https://www.3dsbiovia.com/products/collaborative-science/biovia-discovery-studio/>).

Для построения модели PseFDH с His-tag на N-конце белковой цепи использовали структуру PDB 2NAC. Общая вводимая последовательность – GlyHis₆SerGly. Такая последовательность должна обеспечивать дополнительную гибкость между аффинной меткой и белковой глобулой. Добавление последовательности проводили в три этапа. Сначала к N-концевому остатку аланина PseFDH был достроен дипептид SerGly. Затем к азоту остатка Ser (новый N-конец полипептидной цепи мономера) вручную подвели фрагмент N-концевого His-tag из структуры 3KKW таким образом, чтобы расстояние между ними и взаимная ориентация прибли-

зительно соответствовали геометрии пептидной группы. Затем N-конец His-tag удлиняли еще на один остаток Gly с помощью опции «EndRepair» модуля Homology. Структуру каждого из полученных таким образом мономеров, сохраненную в виде отдельного PDB-файла, использовали в качестве начальной структуры PseFDH с His-tag на N-конце для дальнейшей регуляризации и молекулярной динамики.

Полноразмерная субъединица PseFDH состоит из 400 аминокислотных остатков, в то время как в рентгеновской структуре 2NAD видно только 393 остатка. Поэтому для построения корректной модели PseFDH с C-концевым His-tag необходимо достроить белковую цепь каждого из мономеров до полного размера. Для построения модели полной белковой цепи использовали модуль Homology упомянутого выше пакета программ. В качестве опорной структуры использовали структуру ФДГ из *Moraxella* sp. C-1 [8], поскольку для нее C-конец разрешен полностью (PDB-код 2GSD, 401 аминокислота). Этот фермент демонстрирует высокую степень гомологии с PseFDH (около 85%).

Для регуляризации начальных структур и проведения расчетов по методу молекулярной динамики был использован пакет AMBER 2017 (<http://ambermd.org/>) [9] с силовым полем ff14SB [10]. С помощью утилиты tleap были достроены координаты всех атомов водорода димера. Димер помещали в ячейку, грани которой отступали как минимум на 12 Å от поверхности белка, ячейка была заполнена молекулами TIP3P воды, заряд системы нейтрализовали путем добавления ионов Na^+ . После этого осуществляли минимизацию, для того чтобы потенциальная энергия взаимодействия введенных пептидных фрагментов друг с другом и полипептидной цепью PseFDH приблизилась к нормальным параметрам (этап регуляризации начальных структур). После чего систему постепенно нагревали до температуры 300 К, затем выполняли этапы выравнивания давления молекул растворителя и приведения системы в равновесие (50 пс). Для обеих моделей проводили молекулярную динамику с периодическими граничными условиями при постоянных температуре и давлении, длительность траектории составляла 10 нс.

С помощью программы PyMol 2.1 (<https://pymol.org/2/>) был проведен визуальный анализ полученных траекторий, чтобы определить влияние His-tag на структуру фермента.

Проведение реакции направленного мутагенеза. Введение точечных замен осуществляли с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). В качестве матрицы использовали плазмиды pPseFDH8, pPseFDH8_D221Q и pPseFDH8_SM4_D221Q, в которых ген *psefdh* находится под контролем сильного промотора РНК-полимеразы фага Т7. Для введения мутаций использовали прямой (PseFDH_His_for) и обратный (Pse_Rev) праймеры на начало и конец гена соответственно, а также прямой и обратный праймеры, несущие требуемую замену в гене *psefdh*. Для получения генов ферментов с His₆ вместо праймера Т7_For использовали праймер PseFDH_His_for. Последовательности праймеров приведены ниже.

PseFDH_His_for	5'-CAAACAATCCATGGGTCACC ACCACCACCACCATTCGGGT GCAAAGGTCCTGTGCGTTCTT TAC-3'
Pse_Rev	5-GGAGCTCGAATTCTCAGA CCGCCTTCTTGAACCTGGCGG CCTCTT C-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 (NH₄)₂SO₄, 100 мМ KCl, 1 мг/мл БСА, 1% (v/v) Тритон X-100, 20 мМ MgSO₄); 2,5 мкл смеси dNTP (dATP, dGTP, dTTP, dCTP, концентрация каждого 2,5 мМ); 1 мкл ДНК-матрицы (~10 нг/мкл); по 2 мкл праймеров (10 нмоль/мл); 0,5 мкл *Pfu* ДНК-полимеразы (2,5 Ед/мкл) и деионизованную воду, добавленную для получения 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, 30 с;
удлинение цепи – 72 °C, 2 мин.

Всего было проведено 25–35 циклов. По окончании последнего цикла реакционную смесь дополнительно выдерживали 5 мин при 72 °C. Температуру на второй стадии выбирали на 3–5 градусов ниже температуры плавления дуплексов, образуемых праймерами.

Продукты ПЦР очищали электрофорезом в 1%-м агарозном геле. Затем продукты ПЦР об-

рабатывали эндонуклеазами рестрикции NcoI и EcoRI. Далее ДНК очищали электрофорезом в 1%-м агарозном геле с последующей экстракцией из геля и лигировали с расщепленной теми же эндонуклеазами рестрикции плазмидой pET28a. После лигирования реакционной смесью трансформировали клетки *E. coli* dH5a, высевали их на чашки Петри с агаризованной средой, содержащей канамицин (30 мкг/мл), и выдерживали 16 ч при 37 °C. Для каждого варианта PseFDH с чашки брали по три колонии и выделяли из них плазмиды. Для контроля введения требуемых мутаций проводили секвенирование плазмидной ДНК в Центре коллективного пользования «Геном» (Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН).

Экспрессия новых His₆-PseFDH в клетках *E. coli*. Экспрессию PseFDH дикого типа и 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 канамицин (30 мкг/мл) и хлорамфеникол (25 мкг/мл). Для приготовления посевного материала с чашки отбирали единичную колонию и культивировали в течение 7–9 ч при 30 °C и 180 об/мин до достижения величины поглощения на длине волны 600 нм ($A_{600} \approx 0,6–0,8$) в 5 мл среды 2YT (дрожжевой экстракт 10 г/л, бактотриптон 16 г/л, хлорид натрия 5 г/л; pH 7,0) в присутствии 30 мкг/мл канамицина и 25 мкг/мл хлорамфеникола. Содержимое пробирок переносили в конические качалочные колбы (1 л) с отбойниками, содержащими 200 мл среды 2YT и 30 мкг/мл канамицина. Клетки культивировали при 30 °C и 80–90 об/мин до достижения величины поглощения на 600 нм ($A_{600} = 0,6–0,8$). 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. Полученную биомассу осаждали на центрифуге «Beckman J-21» (США) при 7500 об/мин в течение 20 мин при 4 °C и 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. Для очистки ферментов, содержащих His-tag, использовали метод аффинной хроматографии. К бесклеточному экстракту добавляли буферный раствор 0,25 М TrisHCl (pH 7,5), содержащий 0,75 М NaCl до концен-

трации NaCl 0,15 М. Полученный раствор фильтровали и наносили на колонку HisTrap HP 1 мл (производитель «GE Healthcare», США), предварительно уравновешенную буфером 0,05 М TrisHCl (pH 7,5), содержащим 0,15 М NaCl. Для элюирования белка с колонки использовали градиент 0–300 мМ концентраций имидазола в аналогичном буфере. Активные фракции фермента обессоливали на колонке с Сефадекс G-25 в натрий-фосфатном буфере (pH 7,0). Контроль чистоты полученных препаратов осуществляли методом аналитического электрофореза в 12%-м полиакриламидном геле в присутствии 0,1%-го додецилсульфата натрия на приборе для электрофореза «MiniProtean II» фирмы «BioRad».

Измерение активности формиатдегидрогеназы. Активность ФДГ определяли спектрофотометрически по накоплению NADH (NADPH) на длине волны 340 нм ($\epsilon_{340} = 6220 \text{ М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$) на спектрофотометре «Schimadzu UV 1800 PC» при 30 °С в 0,1 М натрий-фосфатном буфере (pH 7,0). Концентрация формиата натрия и NAD(P)^+ в кювете составляла 0,6 М и 1 мг/мл соответственно.

Определение констант Михаэлиса. Константы Михаэлиса по NAD^+ , NADP^+ и формиату определяли на основании зависимостей активности фермента от концентрации (0,4–6,0 K_M) соответствующего субстрата. Концентрация второго субстрата была насыщающей ($>15 K_M$). Точные концентрации исходных растворов NAD^+ и NADP^+ определяли спектрофотометрически на длине волны 260 нм ($\epsilon_{260} = 17\,800 \text{ М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$). Раствор формиата натрия с заданной концентрацией готовили, растворяя нужное количество субстрата в 0,1 М натрий-фосфатном буфере (pH 7,0). Объем раствора доводили до нужного в мерной колбе. Значения K_M были рассчитаны из экспериментальных зависимостей методом нелинейной регрессии с помощью программы Origin Pro 8.5.

Изучение кинетики термоинактивации. Термостабильность ферментов измеряли в 0,1 М натрий-фосфатном буфере (pH 7,0) при нескольких 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 $\pm 0,1$ °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. Константу скорости термоинактивации $k_{\text{ин}}$ 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

Молекулярное моделирование положения гистидиновой метки. На рис. 1 представлены результаты моделирования структуры PseFDH, в которую добавлена последовательность His-tag на N- и С-концы аминокислотной последовательности фермента дикого типа (PseFDH wt) соответственно. На рис. 1, А показано, что His-tag на N-конце расположена вдали от активного центра фермента, она не взаимодействует с белковой глобулой и свободно вращается в пространстве. Во втором случае (His-tag на С-конце) аффинная метка также не взаимодействует с белковой глобулой и ориентирована в раствор, однако она расположена на входе в активный центр в районе кофермент-связывающего домена. Наличие в этой группе нескольких (до шести) положительных зарядов позволяет предположить, что она может взаимодействовать с отрицательно заряженной пирогосфатной группой NAD^+ , ухудшая связывание кофермента в активном центре. Вероятно, именно наличие дополнительных положительных зарядов остатков гистидина за счет введения His-tag на С-конец формиатдегидрогеназы из *O. parapolyomorpha* DL-1 (OpaFDH) приводит к тому, что по сравнению с ферментом дикого типа значение K_M по формиату уменьшается с 1,2 до 0,5 мМ, а константа Михаэлиса по NAD^+ возрастает в 7 раз – с 12 до 84 мкМ [4, 5].

Получение мутантных ферментов. По результатам молекулярного моделирования было решено ввести His-tag на N-конец PseFDH. Поскольку на практике используются как исходный NAD^+ -зависимый фермент (PseFDH wt), так и его NADP^+ -специфичные мутанты, нами были получены три варианта фермента с His-tag на N-конце – His₆-PseFDH, His₆-PseFDH D221Q и His₆-PseFDH D221Q/SM4. Замена D221Q обеспечивает изменение коферментной специфичности PseFDH от NAD^+ к NADP^+ [11, 12]. Четыре дополнительные замены SM4 обеспечивают повышение химической и температурной стабильности [13]. Плазмиды, содержащие гены His₆-PseFDH, His₆-PseFDH D221Q и His₆-PseFDH D221Q/SM4 были получены с помощью полимеразной цепной

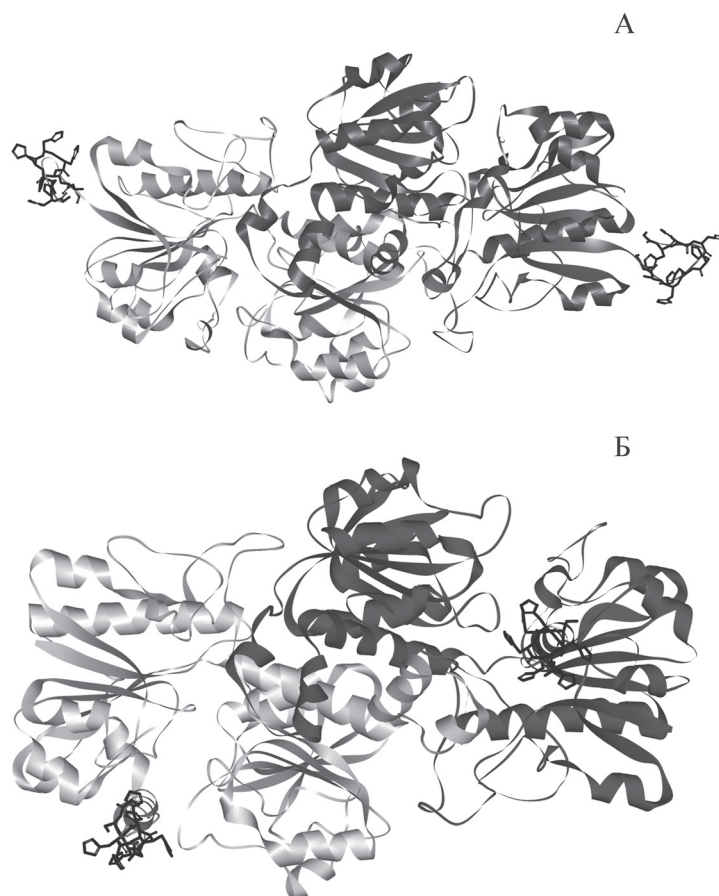


Рис. 1. Модельные структуры форматдегидрогеназы из *Pseudomonas* sp. 101 с последовательностями His₆ на N-конце (А) и С-конце (Б) фермента. Субъединицы фермента представлены в виде комбинации структурных элементов и выделены светло- и темно-серым цветом, остатки His изображены в виде плочек. Условия моделирования даны в «Экспериментальной части»

реакции, как описано в разделе «Экспериментальная часть». Результаты секвенирования показали, что во всех плазмидах в гене *psefdh* отсутствуют посторонние нуклеотидные замены.

Для получения новых ферментов их экспрессировали в клетках *E. coli* BL21(DE3)/pLysS. Все три формы PseFDH с His-tag на N-конце экспрессировались в активной и растворимой формах. Уровень экспрессии не отличался от такового для ферментов без His-tag. Ферменты были очищены в одну стадию практически до гомогенного состояния с помощью металлохелатной хроматографии по методике, представленной выше в разделе «Экспериментальная часть». Результаты представлены на рис. 2. Ферменты без His-tag были получены и очищены по методике, разработанной ранее в нашей лаборатории [12, 14].

Кинетические свойства ФДГ с His-tag.

В табл. 1 представлены данные по константам

Михаэлиса и каталитическим константам для PseFDH, содержащих His-tag. Из табл. 1 видно, что как в случае NAD⁺-зависимого фермента дикого типа, так и в случае мутантов, обладающих специфичностью к NADP⁺, His-tag практически не влияет на кинетические свойства. Это находится в полном соответствии с нашими результатами по моделированию (см. выше). Таким образом, новые PseFDH, содержащие His-tag на N-конце, могут быть успешно использованы для регенерации кофактора в процессах хирального синтеза с помощью оксидоредуктаз.

Определение температурной стабильности ферментов. Нами было проведено сравнительное исследование зависимости термостабильности от введения His-tag на N-конец PseFDH. На рис. 3 представлены зависимости остаточной активности от времени для трех форм PseFDH, содержащих и не содержащих His-tag. На рис. 3 показано, что в случае NAD⁺-

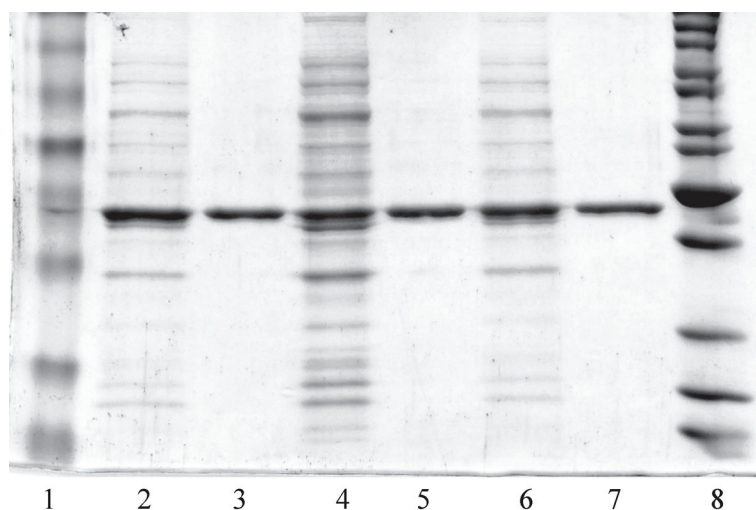


Рис. 2. Аналитический электрофорез в присутствии DDS-Na различных форм PseFDH. (1, 8 – белки-маркеры молекулярной массы; 2, 3 – His₆-PseFDH D221Q/SM4 до и после очистки соответственно; 4, 5 – His₆-PseFDH D221Q до и после очистки соответственно; 6, 7 – His₆-PseFDH до и после очистки соответственно)

зависимого фермента различие в стабильности минимально и не превышает ошибки эксперимента. В случае NADP⁺-специфичной PseFDH D221Q термостабильность снижается на 10–20%. В случае D221Q/SM4 (более термостабильного варианта His₆-PseFDH) также происходит уменьшение термостабильности, но оно минимально и находится в пределах ошибки эксперимента.

Для более детального изучения влияния введения His₆ на термостабильность различных PseFDH нами была изучена кинетика их термоинактивации при разной температуре (60–71 °C). На рис. 4 в качестве примера представлены результаты экспериментов для His₆-PseFDH. Для других ферментов были получены

аналогичные зависимости. Из тангенсов углов наклона этих прямых были рассчитаны константы скорости термоинактивации. Наблюдаемые величины констант скорости инактивации не зависят от концентрации фермента во всем исследованном диапазоне значений температуры, что свидетельствует об истинном мономолекулярном механизме процесса термоинактивации. На рис. 5 представлены зависимости величины наблюдаемых констант скорости инактивации первого порядка $k_{ин.}$ в координатах $\ln(k_{ин.}/T)$ от $1/T$, где T – температура в градусах Кельвина. Линейная зависимость вторичных графиков свидетельствует, что процесс термоинактивации нативной и мутантных ФДГ описывается уравнением для зависимости константы скоро-

Т а б л и ц а 1

Каталитические свойства PseFDH дикого типа и мутантных форм фермента (0,1 М натрий-фосфатный буфер; 0,01М ЭДТА; pH 7,0)

Фермент	$K_M^{NAD(P)^+}$, мкМ	$K_M^{HCOO^-}$, мМ	$k_{кат.}$, с ⁻¹	$k_{кат.}/K_M^{NAD(P)^+}$, с ⁻¹ ·мкМ ⁻¹	$k_{кат.}/K_M^{HCOO^-}$, с ⁻¹ ·мМ ⁻¹
PseFDH wt*	32±2	1,0±0,1	7,3±0,2	0,228	7,30
His ₆ -PseFDH*	39±2	1,1±0,1	7,2±0,2	0,185	6,55
PseFDH D221Q**	110±10	22±2	4,3±0,3	0,0391	0,200
His ₆ -PseFDH D221Q**	140±20	31±2	4,2±0,3	0,0300	0,136
PseFDH D221Q/SM4**	100±10	110±20	5,0±0,3	0,0500	0,0455
His ₆ -PseFDH D221Q/SM4**	120±10	100±10	5,2±0,3	0,0433	0,0520

* В качестве кофермента использовали NAD⁺; ** в качестве кофермента использовали NADP⁺.

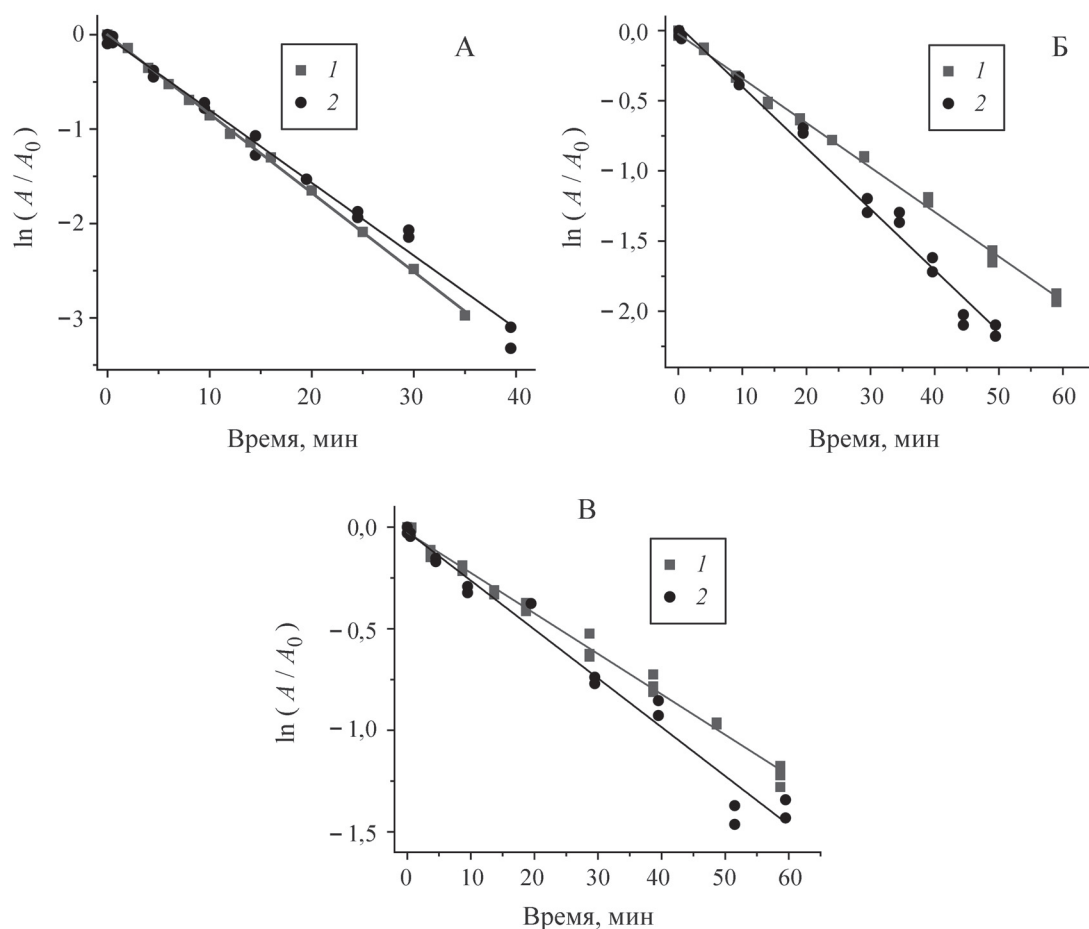


Рис. 3. Изучение влияния His-tag на термостабильность различных PseFDH: А – PseFDH wt (1), His₆-PseFDH (2) (65 °C); Б – PseFDH D221Q (1), His₆-PseFDH D221Q (2) (64 °C); В – PseFDH D221Q/SM4 (1), His₆-PseFDH D221Q/SM4 (2) (66 °C); 0,1 М натрий-фосфатный буфер (pH 7,0)

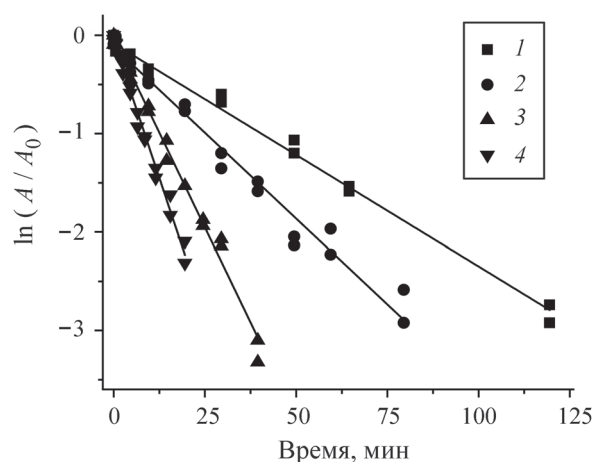


Рис. 4. Зависимость логарифма остаточной активности His₆-PseFDH от времени при разных значениях температуры, °C: 1 – 63, 2 – 64, 3 – 65, 4 – 66; 0,1 М натрий-фосфатный буфер (pH 7,0)

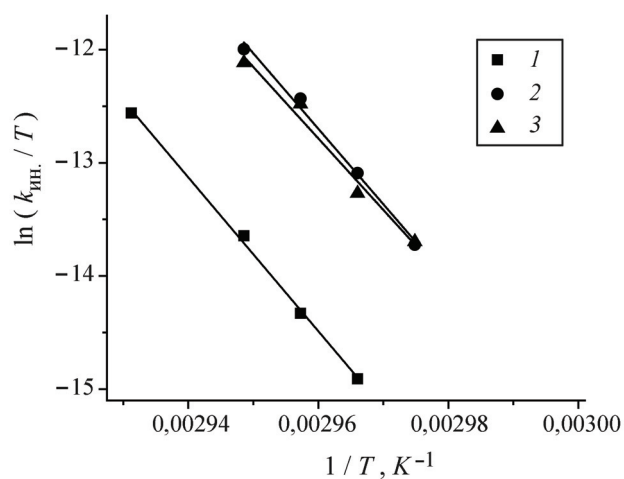


Рис. 5. Зависимость константы скорости термоинактивации His₆-PseFDH D221Q/SM4 (1), His₆-PseFDH D221Q (2) и His₆-PseFDH (3) от температуры в координатах $\ln(k_{\text{инн}}/T) - 1/T$; 0,1 М фосфатный буфер (pH 7,0)

Т а б л и ц а 2

Активационные параметры процесса термоинактивации различных PseFDH

Фермент	$\Delta H^\ddagger$, кДж/моль	$\Delta S^\ddagger$, Дж/(моль·К)
PseFDH wt	560±20	1320±70
His ₆ -PseFDH	525±80	1250±160
PseFDH D221Q	610±10	1490±30
His ₆ -PseFDH D221Q	560±30	1340±100
PseFDH D221Q/SM4	550±50	1300±110
His ₆ -PseFDH D221Q/SM4	570±20	1350±50

сти от температуры из теории активированного комплекса [15]. Это уравнение может быть представлено в линейном виде:

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

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

где k_B и h – это константы Больцмана и Планка соответственно, R – универсальная газовая постоянная, $\Delta H^\ddagger$ и $\Delta S^\ddagger$ – активационные параметры. Численные значения активационных параметров $\Delta H^\ddagger$ и $\Delta S^\ddagger$ процесса термоинактивации представлены в табл. 2, где показано, что все величины находятся в одном диапазоне. Таким образом, можно утверждать, что для разворачивания белковой глобулы всех мутантных форм затрачивается примерно одинаковое количество энергии.

Выводы

В результате проделанной работы на основании компьютерного анализа были получены форматдегидрогеназа из бактерий *Pseudomonas* sp. 101 дикого типа и две ее мутантные NADP⁺-специфичные формы, содержащие на N-конце His₆-последовательность. Введение аффинной метки His-tag позволило в одну стадию получать практически гомогенные препараты ферментов. Кроме того, наличие такой последовательности не влияет на каталитические свойства ферментов, которые могут быть использованы для получения гибридных ферментов на основе форматдегидрогеназы PseFDH.

Работа выполнена при частичной поддержке Российского научного фонда (проект № 18-74-00146).

Конфликта интересов нет.

Дополнительных материалов нет.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hengen P. N. // Trends Biochem. Sci. 1995. Vol. 20. N 7. P. 285.
- Arnau J., Lauritzen C., Petersen G.E., Pedersen J. // Protein Expr. Purif. 2006. Vol. 48. N 1. P. 1.
- Hochuli E., Bannwarth W., Döbeli H., Gentz R., Stüber D. // Nature Biotechnology. 1988. Vol. 6. N 11. P. 1321.
- Yu S., Zhu L., Zhou C., An T., Zhang T., Jiang B., Mu W. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2014. Vol. 98. N 4. P. 1621.
- Tishkov V.I., Pometun A.A., Stepashkina A.V., Fedorchuk V.V., Zarubina S.A., Kargov I.S., Atroshenko D.L., Parshin P.D., Kovalevski R.P., Boiko K.M., Eldarov M.A., D'Oronzio E., Facheris S., Secundo F., Savin S.S. // Moscow Univ. Chem. Bull. 2018. Vol. 73. N 2. P. 1 (DOI 10.3103/S0027131418020153).
- Ordu E.B., Karagüler N.G. // Prepar. Biochem. Biotechnol. 2007. Vol. 37. N 4. P. 333.
- Esen H., Alpdağtaş S., Mervan Çakar M., Binay B. // Prepar. Biochem. Biotechnol. 2019. Vol. 49. N 5. P. 529.
- Shabalin I.G., Filippova E.V., Polyakov K.M., Sadykhov E.G., Safonova T.N., Tikhonova T.V., Tishkov V.I., Popov V.O. // Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 2009. Vol. 65. N 12. P. 1315 (DOI:10.1107/S0907444909040773).
- Case D.A., Cerutti D.S., Cheatham III T.E., Darden T.A., Duke R.E., Giese T.J., Gohlke H., Goetz A.W., Greene D., Homeyer N., Izadi S., Kovalenko A., Lee T.S., LeGrand S., Li P., Lin C., Liu J., Luchko T., Luo R., Mermelstein D., Merz K.M., Monard G., Nguyen H., Omelyan I., Onufriev A., Pan F., Qi R., Roe D.R., Roitberg A., Sagui C., Simmerling C.L., Botello-Smith W.M., Swails J., Walker R.C., Wang J., Wolf R.M., Wu X., Xiao L., York D.M., Kollman P.A. AMBER 2017, University of California, San Francisco.
- Maier J.A., Martinez C., Kasavajhala K., Wickstrom L., Hauser K.E., Simmerling C. // J. Chem. Theory Comput. 2015. Vol. 11. P. 3696.
- Alekseeva A., Dolina I., Kargov I., Savin S., Tishkov V. // Prot. Sci. 2015. Vol. 24. N S1. P. 174 (DOI: 10.1002/pro.2823).

12. 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.
13. D'Oronzo E., Secundo F., Minofar B., Kulik N., Pometun A.A., Tishkov V.I. // *ChemCatChem* 2018. Vol. 10. N 15. P. 3247 (DOI: 10.1002/cctc.201800145).
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 (DOI: 10.1016/S0014-5793(99)00127-1).
15. Cornish-Bowden A. / *Fundamentals of Enzyme Kinetics* // Wiley-Blackwell. 2012. 4th Edition. ISBN: 978-3-527-33074-4. 510 pages.

Поступила в редакцию 10.03.2020

Получена после доработки 12.03.2020

Принята к публикации 20.03.2020

INFLUENCE OF HIS₆ SEQUENCE ON PROPERTIES OF FORMATE DEHYDROGENASE FROM BACTERIUM *PSEUDOMONAS* SP. 101

A.A. Pometun^{1,2,3}, P.D. Parshin^{2,3}, N.P. Galanicheva², I.V. Uporov²,
D.L. Atroshenko^{1,2,3}, S.S. Savin^{2,3}, V.I. Tishkov^{1,2,3*}

(¹A.N. Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences; ²Department of Chemistry, M.V. Lomonosov Moscow State University; ³Innovations and High Technologies MSU Ltd; *e-mail: vitishkov@gmail.com)

NAD(P)⁺-dependent formate dehydrogenase (FDH, EC 1.2.1.2.) is actively used in processes of chiral synthesis by oxidoreductases with systems of reduced cofactor regeneration. Efficient use of FDH in such systems requires simple and fast enzyme purification method. Metal-chelating affinity chromatography is widely used for such purposes. The method requires presence of six (or more) His residues at N- or C-terminus of protein. Addition of extra His residues can influence enzyme properties. Computer modeling of structure of FDH from bacterium *Pseudomonas* sp. 101 with different positions of His₆ sequence showed that optimal case is His-tag at N-terminus. Three types of PseFDH with His₆ were prepared – wild-type NAD⁺-dependent enzyme and two mutant NADP⁺-specific forms. New PseFDHs were obtained as homogeneous preparations through one step purification procedure. Comparison of properties of PseFDHs with and without His-tag showed that they have similar kinetic properties.

Key words: formate dehydrogenase, *Pseudomonas* sp.101, affinity chromatography, catalytic properties, thermal stability, His-tag.

Сведения об авторах: Пометун Анастасия Александровна – ст. науч. сотр. лаборатории молекулярной инженерии Института биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, ст. науч. сотр. ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, докт. хим. наук (aapometun@gmail.com); Паршин Павел Дмитриевич – мл. науч. сотр. ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», аспирант химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (parshin.p04@gmail.com); Галаничева Наталья Павловна – студентка химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (gnatalia0@gmail.com); Упоров Игорь Владимирович – вед. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, канд. физ.-матем. наук (uporov@gmail.com); Атрошенко Денис Леонидович – мл. науч. сотр. лаборатории молекулярной инженерии Института биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, науч. сотр. ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, канд. хим. наук (atrdenis@gmail.com); Савин Святослав Сергеевич – науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», канд. биол. наук (savinslava@gmail.com); Тишков Владимир Иванович – профессор химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, зав. лабораторией молекулярной инженерии Института биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук; ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», докт. хим. наук, профессор (vitishkov@gmail.com).