

УДК 577.1 577.15

ИЗМЕНЕНИЕ ВЕЛИЧИНЫ ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ ТОЧКИ ФОРМИАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ МЕТОДОМ РАЦИОНАЛЬНОГО ДИЗАЙНА

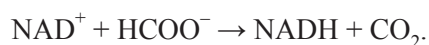
А.А. Алексеева^{1,3}, А.С. Петров², В.В. Федорчук², Е.А. Федорчук², Т.А. Осипова²,
В.И. Тишков^{1,2,3*}

(¹Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН; ²кафедра энзимологии химического факультета МГУ; ³ООО «Инновации и высокие технологии МГУ»; *e-mail: vitishkov@gmail.com)

Для расширения рН-оптимума стабильности NAD⁺-зависимой формиатдегидрогеназы (ФДГ, КФ 1.2.1.2) из бактерии *Pseudomonas* sp. 101 (PseФДГ) методом направленного мутагенеза получены четыре мутантных фермента с заменами Lys112Pro, Lys231Ala, Lys231Ser и Lys317Asn. Выбор положений и типа аминокислоты для замены был сделан на основе выравнивания аминокислотных последовательностей ФДГ из разных источников, а также анализа трехмерной структуры PseФДГ. Для всех полученных мутантных форм проведено изучение кинетических свойств и температурной стабильности. Показано, что замены в положениях 112 и 231 приводят к небольшому улучшению кинетических свойств, в то время как для мутанта Lys317Asn наблюдалось снижение сродства к коферменту. Изучение температурной стабильности полученных ферментов показало, что замены в положениях 112 и 231 приводят лишь к небольшой дестабилизации фермента, а замена Lys317Asn вызывает значительную потерю в термостабильности. Для всех полученных мутантных форм наблюдалось снижение изоэлектрической точки примерно на 0,1 единицу.

Ключевые слова: формиатдегидрогеназа, *Pseudomonas* sp.101, белковая инженерия, рациональный дизайн, изоэлектрическая точка.

NAD⁺-зависимая формиатдегидрогеназа (ФДГ; КФ 1.2.1.2) катализирует реакцию окисления формиат-иона до углекислого газа при сопряженном восстановлении NAD⁺ до NADH:



Этот фермент представляет большой научный и практический интерес. ФДГ используется для регенерации NADH в процессах хирального синтеза с участием NAD(P)⁺-зависимых оксидоредуктаз.

Исследуемый в нашей лаборатории фермент из мезофильной бактерии *Pseudomonas* sp.101 (PseФДГ) является одной из самых стабильных из всех известных в настоящее время формиатдегидрогеназ [1, 2]. Ген этого фермента клонирован, создана также векторная конструкция, обеспечивающая его эффективную экспрессию в клетках бактерий *E. coli* [2, 3]. В настоящее время для ФДГ из *Pseudomonas* sp.101 в банке данных pdb.org имеется несколько трехмерных структур, полученных в результате рентгеноструктурного анализа [2, 4, 5]. Все эти данные позволяют проводить систематические исследования взаимосвязи структуры и свойств фермента, а также эксперименты по белковой инженерии. Так, для PseFDH получены мутантные формы с заменой остатка Cys255, обла-

дающие повышенной химической стабильностью [6, 7], проведено увеличение температурной стабильности за счет гидрофобизации α -спиралей в молекуле белка [8]. Получены также мутантные формы ФДГ из *Pseudomonas* sp.101 с измененной коферментной специфичностью [1].

На данный момент помимо повышения термостабильности и изменения каталитических свойств PseФДГ актуальной задачей является расширение рН-оптимума стабильности фермента в кислой области. Низкая стабильность PseФДГ при рН $\leq 5,5$ обусловлена величиной его изоэлектрической точки, равной 5,2 [9]. При этих значениях рН фермент выпадает в осадок и необратимо инактивируется. Таким образом, использование ФДГ не представляется возможным в биотехнологических процессах, проводимых при таких низких значениях рН.

Цель данной работы – получение с помощью точечных аминокислотных замен мутантных форм PseФДГ с пониженным значением изоэлектрической точки.

Экспериментальная часть

Проведение реакции направленного мутагенеза

Введение точечных замен проводили с помощью двустадийной полимеразной цепной реакции (ПЦР).

В качестве матрицы использовали плазмиду pFDH8, в которой ген *psefdh* находится под контролем промотора РНК-полимеразы фага T7. Для введения мутаций использовали прямой (T7_For) и обратный (T7_Rev) праймеры на начало и конец гена соответственно, а также прямой и обратный праймеры, несущие требуемую замену в гене *psefdh*. Последовательности праймеров приведены на схеме.

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 дезоксинуклеотидтрифосфата 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). К смеси добавляли деионизованную воду до общего объема 25 мкл. ПЦР проводили в тонкостенной пластиковой пробирке объемом 0,5 мл («SSI», США) на приборе «Терцик» («ДНК-Технологии», Россия). Для предотвращения испарения реакционной смеси в пробирку добавляли 30 мкл минерального масла. Пробирку прогревали в течение 5 мин при 95°C и затем проводили реакцию по следующей программе: денатурация (95°C, 30 с), связывание праймеров (54–58°C), удлинение цепи (72°C, 2 мин), всего 25–35 циклов. После последнего цикла реакционную смесь дополнительно выдерживали в

течение 5 мин при 72°C. Температуру на второй стадии выбирали на 3–5° ниже температуры плавления дуплексов (T_m), образуемых праймерами.

При проведении первых двух ПЦР использовали праймеры T7_For/Ps(mut)_Rev (фрагмент 1)* и Ps(mut)_For/T7_Rev (фрагмент 2)** соответственно (где mut – название соответствующей мутации). Продукты ПЦР (фрагмент 1 и фрагмент 2) очищали электрофорезом в 1%-м агарозном геле. Затем проводили третью (объединяющую) ПЦР с праймерами T7For и T7Rev, где в качестве ДНК-матрицы использовали полученные ранее фрагменты 1 и 2. Продукт третьей ПЦР очищали аналогично фрагментам 1 и 2 и обрабатывали эндонуклеазами рестрикции NdeI и EcoRI. Затем ДНК очищали электрофорезом в 1%-м агарозном геле с последующей экстракцией из геля и лигировали с расщепленной теми же эндонуклеазами рестрикции плазмидой pFDH8. После лигирования реакционной смесью трансформировали клетки *E. coli* Mach1. Затем клетки высевали на чашки Петри с агаризованной средой, содержащей ампициллин (150 мкг/мл), и выдерживали 16 ч при 37°C. Для каждого мутанта с чашки брали по три колонии и из них выделяли плазмиды. Для контроля введения требуемых мутаций проводили секвенирование плазмидной ДНК в Центре коллективного пользования «Геном» (Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН).

С х е м а

T7_For 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'

T7_Rev 5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG -3'

PsK112P_For 5'-GCCAAGGCCCCAAACCTGAAGCTCGCGC-3'

PsK112P_Rev 5'-GCTTCAGGTTTGGGGCCTTGGCGATGCG-3'

PsK231A_For 5'-TCGGTCGAGGCGGAACCTCAACCTCACCTGGC-3'

PsK231A_Rev 5'-GTTGAGTTCCGCCTCGACCGATTCCGGCAG-3'

PsK231S_For 5'-TCGGTCGAGAGCGAACTCAACCTCACCTGGC-3'

PsK231S_Rev 5'-GTTGAGTTCCGCTCTCGACCGATTCCGGCAG-3'

PsK317N_For 5'-GCGCCGAACGACCACCCCTGGCGGACG-3'

PsK317N_Rev 5'-GGGTGGTCGTTCCGGCGCCGGCTGC-3'

*Фрагмент 1 – участок ДНК, содержащий мутацию и последовательность до нее; **фрагмент 2 – участок ДНК, содержащий мутацию и последовательность после нее.

Трансформация и культивирование

Трансформацию клеток *E. coli* BL21(DE3) плазмидной ДНК проводили согласно методике, описанной Манниатисом и соавторами: 4 мл ночной культуры разбавляли в 100 раз в среде 2YT (16 г/л триптона, 10 г/л дрожжевого экстракта, 1 г/л двузамещенного фосфата натрия, 1,5 г/л однозамещенного фосфата калия) и выращивали при аэрировании в течение 2–3 ч при 37°C. Далее культуральную жидкость центрифугировали 2 мин при 5000 об/мин в центрифуге «Eppendorf 5403» при 4°C. Осадок клеток охлаждали до 0°C, ресуспендировали в 1 мл охлажденного до 0°C 50 mM раствора CaCl₂ и после 30 мин инкубации во льду при 0°C снова центрифугировали в тех же условиях. Осадок клеток ресуспендировали в 100 мкл холодного 50 mM раствора CaCl₂ и инкубировали 3–4 ч при 0°C. Для трансформации смешивали 100 мкл компетентных клеток и 1–10 мкл раствора плазмидной ДНК или реакционной смеси после мутагенеза или лигирования и инкубировали смесь в течение 60 мин при 0°C. Затем смесь клеток подвергали тепловому шоку при 42°C в течение 1–1,5 мин и охлаждали до 0°C во льду (1 мин). Далее в пробирку добавляли 1 мл среды 2YT, инкубировали трансформированные клетки при 37°C при легкой аэрации в течение 1 ч и высевали на чашки Петри с агаризованной средой (1,5%), содержащей ампициллин в концентрации 100 мкг/мл.

Препаративную наработку биомассы клеток *E. coli* BL21(DE3), содержащих требуемые мутанты ФДГ, проводили при 30°C в 50 или 200 мл среды (16 г/л триптона, 10 г/л дрожжевого экстракта, 1 г/л хлорида натрия, 1,5 г/л однозамещенного фосфата натрия, 1 г/л двузамещенного фосфата калия, 1%-й глицерин, 100 мкг/мл ампициллина и 25 мкг/мл хлорамфеникола) в специальных качалочных колбах объемом 250 мл или 1 л, содержащих соответственно 2 или 4 отбойника. Объем посеваемого материала составлял 10–15% от общего объема среды. Индуктор биосинтеза ФДГ (лактозу) добавляли до конечной концентрации 20 мг/мл по достижении поглощения суспензии клеток при 600 нм (A_{600}) 0,5–0,7. Затем клетки культивировали при максимальной аэрации в течение ночи. Клетки осаждали центрифугированием на центрифуге «Beckman J-21» (США) при 8000 об/мин в течение 20 мин при 4°C.

Очистка ферментов

Мутантные ферменты, экспрессированные в клетках *E. coli*, очищали согласно методике, разработанной для рекомбинантного PseФДГ дикого типа [8]. Процедура очистки фермента включала разрушение клеток (суспензия 1 г биомассы в 10 мл 0,1 М калий-фосфатного буфера; 0,02 М ЭДТА; pH 8,0) при 0°C на

ультразвуковом дезинтеграторе «BraundSonic» (Германия), высаживание балластных белков сульфатом аммония (35% от насыщения), гидрофобную хроматографию на фенилсефарозе и гель-фильтрацию на колонке с Сефакрил S-200. Контроль чистоты осуществляли с помощью аналитического электрофореза в 12%-м полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (аппаратура для электрофореза фирмы «BioRad»).

Измерение кинетических параметров

Активность и кинетические константы ФДГ определяли спектрофотометрически по накоплению NADH при длине волны 340 нм ($\epsilon_{340} = 6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) на спектрофотометре «Schimadzu UV 1800» при 30°C в 0,1 М калий-фосфатном буфере, pH 7,0. Измерение точной концентрации исходных растворов NAD⁺ проводили при длине волны 260 нм ($\epsilon_{260} = 17800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Измерение термостабильности

Термостабильность мутантных PseФДГ и рекомбинантного фермента дикого типа измеряли в 0,1 М калий-фосфатном буфере (pH 7,0). Для каждого перпарата PseФДГ готовили серию из пластиковых пробирок (1,5 мл), в каждой из которых находилось по 100 мкл раствора фермента (0,2 мг/мл). Пробирки помещали в предварительно прогретый до необходимой температуры водный термостат (точность термостатирования $\pm 0,1^\circ\text{C}$). В определенные моменты времени отбирали по одной пробирке и переносили в лед на 5 мин. Остаточную активность ФДГ измеряли, как описано выше. Константу скорости термоинактивации ($k_{\text{ин}}$) определяли как тангенс угла наклона прямой графика зависимости величины остаточной активности от времени (полулогарифмические координаты $A/A_0 - t$) методом линейной регрессии, используя программу «Origin Pro 8.5».

Определение изоэлектрической точки

Изоэлектрофокусирование PseФДГ дикого типа и ее мутантов проводили на приборе фирмы «Bio Rad» по протоколам фирмы-изготовителя с небольшой модификацией: для фиксации полиакриламидного геля на пластиковую подложку наносили силиконизирующий агент «SurfaSil» и ждали в течение 20–30 мин до полного высыхания, после чего заливали гель.

Окрашивание геля проводили как по белку с помощью Кумасси G-250, так и по активности [10]. Для окрашивания по активности пластинку с гелем сразу после завершения изоэлектрофокусирования помещали на 15 мин в 0,1 М калий-фосфатный буфер (pH 7,5), содержащий 1,5 мг/мл NAD⁺, 0,3М

формиат, 0,2 мМ феназинметасульфат и 0,5 мМ нитротетразолий синий. По завершении реакции окрашивания (10–20 мин) гель тщательно промывали водой и для фиксации выдерживали в 7,5%-й CH_3COOH в течение 20 мин.

Результаты и их обсуждение

Анализ пространственной структуры и выбор положений для направленного мутагенеза

Значение изоэлектрической точки белков связано с относительным содержанием положительно и отрицательно заряженных групп, расположенных на поверхности белковой глобулы. Чем больше количество положительно заряженных групп (или меньше отрицательно заряженных групп), тем выше pI белка, и наоборот.

Таким образом, изоэлектрическую точку можно понизить либо удалением положительного заряда с поверхности белковой глобулы, либо введением дополнительного отрицательного заряда. Мы выбрали первый способ, поскольку теоретически предсказать эффект удаления заряженной группы с поверхности белка намного легче, чем количественно оценить последствия введения дополнительного заряда. Выбор в пользу удаления заряженных остатков с поверхности связан также с тем, что формиатдегидрогеназа и так содержит на своей поверхности большое количество заряженных групп. В каждой из субъединиц фермента содержится 23 остатка Arg (5,75%), 19 остатков Lys (4,75%), 27 остатков Asp (6,75%) и 23 остатка Glu (5,75%). Кроме того, при $pH < 6$ имидазольное кольцо остатка гистидина (16 остатков, 4,0%) должно иметь положительный заряд. Таким образом, доля заряженных остатков в составе PseФДГ составляет 24,5%, а это для белков большая величина.

На поверхности глобулы PseФДГ среди положительно заряженных аминокислотных остатков в свободном виде наиболее часто встречаются остатки лизина. Другие остатки (аргинина и гистидина) представлены меньше. Кроме того, остатки аргинина по сравнению с остатками лизина гораздо чаще участвуют в многоточечных электростатических взаимодействиях. К тому же удаление остатков лизина с поверхности белковой глобулы может благоприятно сказаться на химической стабильности фермента. Известно, что после остатков цистеина остатки лизина являются наиболее вероятной мишенью для химической модификации, которая обычно приводит к инактивации белка. В связи с вышесказанным было решено снизить значение изоэлектрической точки фермента за счет замен именно остатков лизина. Кандидаты на замену остатка Lys должны удовлетворять следующим требованиям:

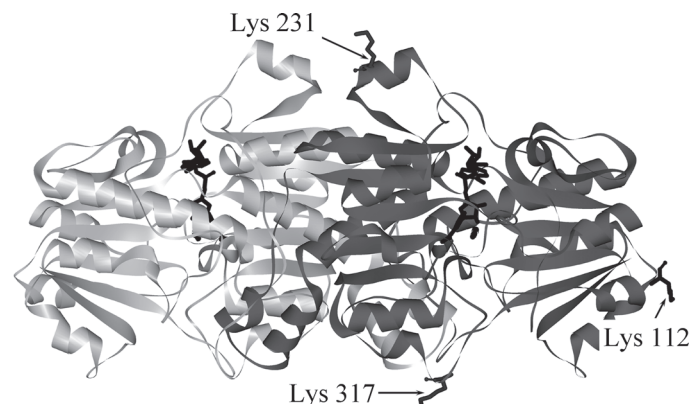


Рис. 1. Пространственная структура тройного комплекса [PseФДГ– NAD^+ – N_3^-] и положение остатков лизина, выбранных для направленного мутагенеза. Субъединицы А и В показаны соответственно серым и черным цветом

- 1) располагаться на поверхности белковой глобулы;
- 2) не участвовать в образовании ионных пар и водородных связей;
- 3) не быть консервативными.

Для выполнения требований 1 и 2 мы провели анализ трехмерной структуры PseФДГ (рис. 1). Для выполнения требования 3 было проведено выравнивание аминокислотных последовательностей ФДГ из разных источников (часть такого выравнивания представлена на рис. 2). На основании такого анализа в качестве мишеней для введения аминокислотных замен были выбраны три неконсервативных остатка лизина в положениях 112, 231 и 317 (рис. 1, 2). Выбор типа вводимого остатка обусловлен тем, какие остатки расположены вместо остатков лизина в гомологичных формиатдегидрогеназах. Из рис. 2 видно, что в бактериальных ФДГ из других источников в положении 112 наиболее часто встречается остаток пролина, в положении 231 встречаются аминокислотные остатки аланина, глутамина, серина и лейцина и, наконец, в положении 317 – остатки аспарагина, пролина и глутамина. Выбранные остатки лизина находятся в разных структурных элементах ФДГ – остаток Lys231 находится внутри спирали αC , а остатки Lys112 и Lys317 расположены в конце и начале спиралей $\alpha 3$ и αG соответственно. Компьютерное моделирование показало, что замены во всех трех положениях не должны приводить к изменению структуры фермента (рис. 3, А–Г). Таким образом, на основании проведенного анализа и компьютерного моделирования было решено получить мутанты PseФДГ с заменами Lys112Pro, Lys231Ala, Lys231Ser и Lys317Asn.

Получение мутантных PseFDH

Введение нуклеотидных замен, обеспечивающих требуемые мутации, проводили с помощью полиме-

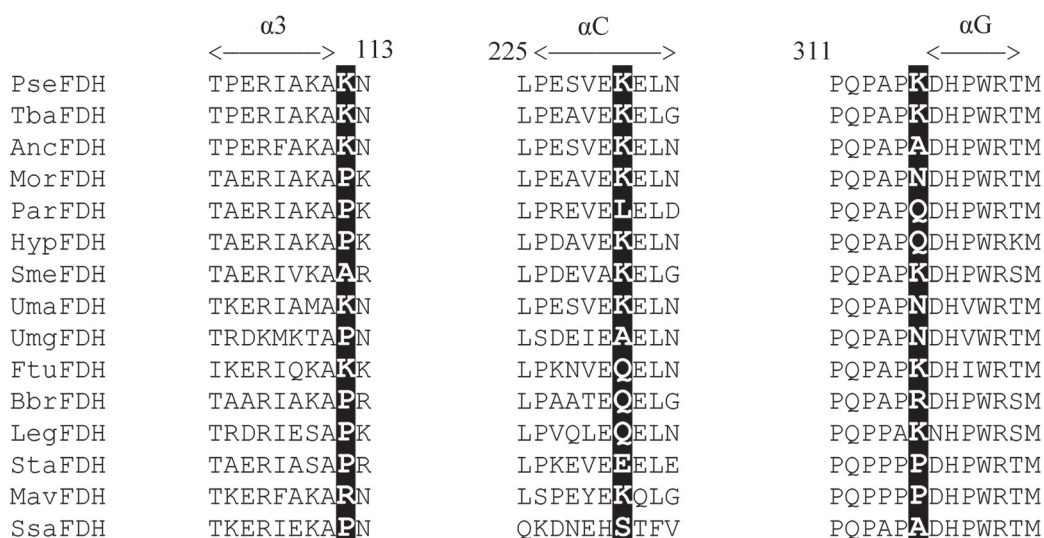


Рис. 2. Выравнивание аминокислотных последовательностей формиадегидрогеназ из различных бактерий. PseFDH – *Pseudomonas* sp.101, TbaFDH – *Thiobacillus* sp. KNK65MA, AncFDH – *Ancylobacter aquaticus*, MorFDH – *Moraxella* sp.C1, ParFDH – *Paracoccus* sp. 12–A, HypFDH – *Hyphomicrobium* strain JT-17, SmeFDH – *Sinorhizobium meliloti*, UmaFDH – uncultured marine alpha proteobacterium cosmid clone HOT2C01, UmgFDH – Uncultured marine gamma proteobacterium EBAC31A08 BAC, FtuFDH – *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* SCHU S4, BbrFDH – *Bordetella bronchiseptica* RB50 (*Alcaligenes bronchisepticus*), LegFDH – *Legionella pneumophila* subsp. *pneumophila* str. *Philadelphia*, StaFDH – *Streptomyces avermitilis*, MavFDH – hypothetical protein MAP3680c *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* str. k10, SsaFDH – *Staphylococcus saprophyticus*. Представлена часть выравнивания для последовательностей, показывающих наименьшую гомологию по отношению друг к другу

разной цепной реакции. Для каждого из четырех мутантов было выделено по три плазмиды. Результаты секвенирования показали, что во всех плаزمидях в гене PseFDH были только требуемые мутации, а другие нуклеотидные замены отсутствовали. Плазмиды, содержащие в гене PseFDH мутации, обеспечивающие замены Lys112Pro, Lys231Ala, Lys231Ser и Lys317Asn, трансформировали в штамм *E. coli* BL21(DE3). Полученные рекомбинантные штаммы культивировали так, как описано ранее. Все мутантные PseFDH экспрессировались в активной и растворимой формах. Они были выделены по методике, представленной выше. Согласно данным аналитического электрофореза, в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия чистота полученных мутантных ферментов составляет не менее 95%.

Кинетические свойства и термостабильность полученных мутантов

Для всех мутантов были определены величины максимальной скорости и константы Михаэлиса по формиаду и NAD^+ . Из величин максимальной скорости и концентрации фермента были рассчитаны значения каталитической константы. Результаты представлены в табл. 1, откуда видно, что аминокис-

лотные замены в положениях 112 и 231 приводят к небольшому улучшению кинетических свойств, в то время как для мутанта PseФДГ Lys317Asn наблюдается снижение сродства к коферменту. Негативное влияние последней замены на каталитические свойства может быть обусловлено ее близким расположением к каталитически важному остатку Gln313 (рис. 2) [11].

Температурную стабильность полученных мутантных PseФДГ и фермента дикого типа исследовали при 62°C. На рис. 4 приведены зависимости остаточной ак-

Т а б л и ц а 1

Константы Михаэлиса по NAD^+ и формиаду для PseFDH дикого типа и ее мутантов*

Фермент	K_m по NAD^+ , мкМ	K_m по формиаду, мМ
wt-PseFDH	60±5	6,5±0,5
PseFDH Lys61Pro [12]	57±6	6,0±0,5
PseFDH Lys 112Pro	57±6	6,0±0,5
PseFDH K231Ala	45±4	4,6±0,4
PseFDH Lys 231Ser	55±4	5,2±0,4
PseFDH Lys 317Asn	103±8	7,9±0,7

*0,1 М фосфатный буфер (pH 7,0), 30°C.

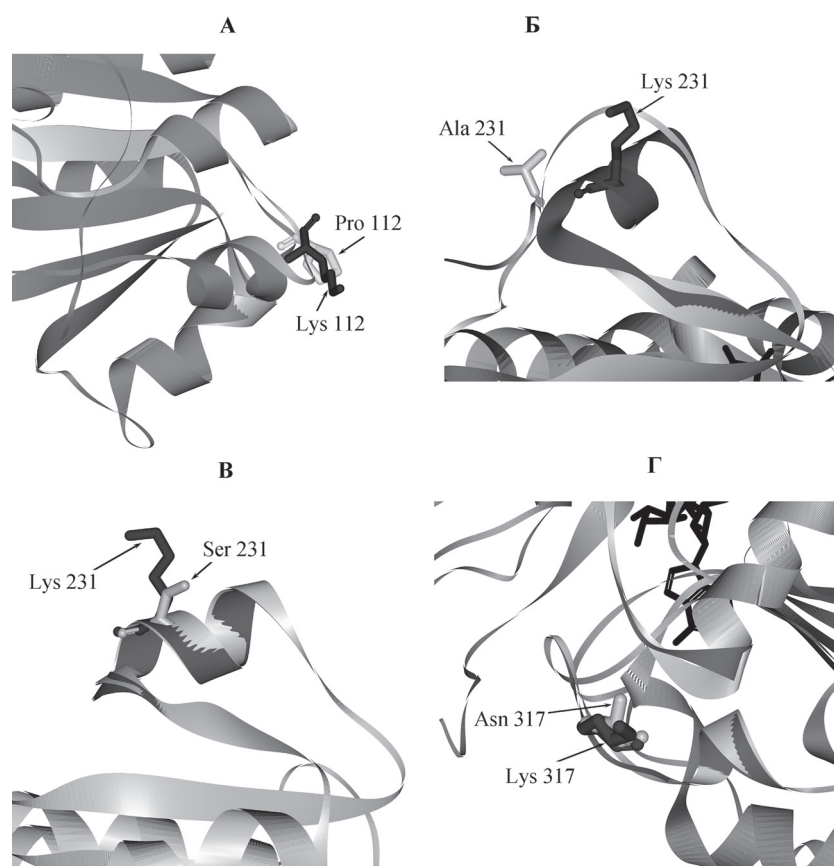


Рис. 3. Компьютерное моделирование аминокислотных замен в структуре PseФДГ. А – Lys112Pro, Б – Lys231Ala, В – Lys231Ser, Г – Lys317Asn

тивности от времени инкубации. Линеаризация этих зависимостей в полулогарифмических координатах свидетельствует о том, что инактивация всех ферментов проходит в соответствии с кинетикой реакции первого порядка. Численные значения констант скоростей

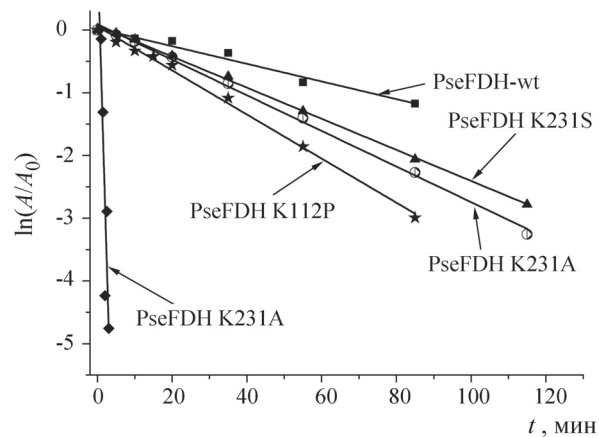


Рис. 4. Термоинактивация PseФДГ дикого типа и ее мутантов с заменами ФДГ Lys112Pro, Lys231Ala, Lys231Ser и Lys317Asn при 62°C (0,1 М фосфатный буфер, рН 7,0)

инактивации полученных мутантов представлены в табл. 2. Из рис. 4 и табл. 2 видно, что замены в положениях 112 и 231 приводят к небольшой дестабилизации фермента. При 62°C мутантная PseФДГ K112P инактивируется в 2,5 раза быстрее, чем фермент дикого типа, а мутантные PseФДГ K231A и PseФДГ K231S в 2 и 1,8 раза. Одновременно с этим для мутанта PseФДГ K317N наблюдается очень большое (более чем в 100 раз) снижение термостабильности. Большой негатив-

Таблица 2

Константы скоростей инактивации формилдегидрогеназы дикого типа и ее мутантов при 62°C (0,1 М фосфатный буфер, рН 7,0)

Фермент	$k_{ин}, \text{мин}^{-1}$
wt PseFDH	$(1,4 \pm 0,1) \times 10^{-2}$
PseFDH Lys 112Pro	$(3,5 \pm 0,1) \times 10^{-2}$
PseFDH K231Ala	$(2,8 \pm 0,1) \times 10^{-2}$
PseFDH Lys 231Ser	$(2,5 \pm 0,1) \times 10^{-2}$
PseFDH Lys 317Asn	$2,0 \pm 0,2$

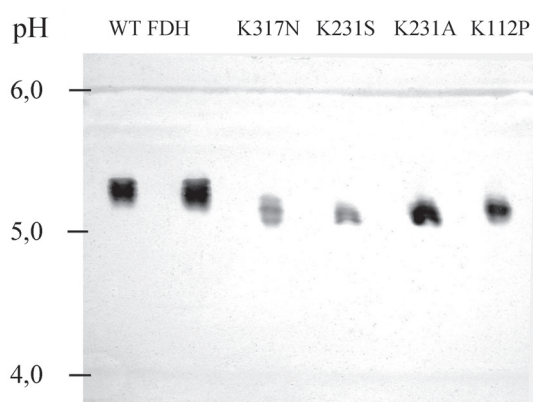


Рис. 5. Изоэлектрофокусирование PseФДГ дикого типа и ее мутантов с заменами ФДГ Lys112Pro, Lys231Ala, Lys231Ser и Lys317Asn в диапазоне рН 4–6 (условия проведения представлены в разделе Экспериментальная часть; окрашивание по активности)

ный эффект, вызванный заменой в положении 317, обусловлен также соседством с каталитически важным остатком Gln313 [11].

Определение изоэлектрической точки

Определение изоэлектрических точек PseФДГ дикого типа и полученных мутантов проводили с помощью изоэлектрофокусирования на амфолинах, создающих линейный градиент рН в диапазоне 4–6 (рис. 5). Из рис. 5 видно, что введение каждой аминокислотной замены приводит к снижению изоэлектрической точки приблизительно на 0,1 ед.

Из рис. 5 также видно, что полученные препараты мутантных PseФДГ и фермента дикого типа имеют микрогетерогенную структуру и представлены набором полос в диапазоне рН 0,1–0,2. Особенно хорошо это заметно у фермента дикого типа. Степень микрогетерогенности фермента возрастает с увеличением времени хранения [12]. Наличие нескольких полос связано с тем, что после выделения может происходить моди-

фикация фермента, связанная, например, с гидролизом остатков аспарагина и глутамина или окислением остатков цистеина, не существенных для катализа [12]. Однако из рис. 5 четко видно, что эффект микрогетерогенности характерен для всех ферментных препаратов, но каждая из замен Lys112Pro, Lys231Ala, Lys231Ser и Lys317Asn дополнительно приводит к снижению величины изоэлектрической точки.

Следующим этапом нашей работы для снижения величины изоэлектрической точки PseФДГ будет объединение точечных замен в один мутантный фермент. Анализ влияния введенных замен на каталитические свойства и стабильность свидетельствует, что для дальнейших экспериментов следует использовать замены Lys112Pro, Lys231Ala, но не Lys317Asn. При замене Lys112Pro каталитические свойства мутантного фермента аналогичны таковым для PseФДГ дикого типа. В случае положения 231 предпочтение следует отдать замене Lys231Ala, так как у него более низкие значения констант Михаэлиса по обоим субстратам, по сравнению с мутантной PseФДГ Lys231Ser (и тем более по сравнению с ферментом дикого типа), а термостабильность всего на 10% ниже. Замены Lys112Pro, Lys231Ala и Lys231Ser приводят к снижению термостабильности в 2,5; 2,0 и 1,8 раза соответственно. Однако такое небольшое снижение может быть легко компенсировано другими аминокислотными заменами, повышающими термостабильность PseФДГ [1, 7, 8]. Третьей заменой может быть Lys61Pro. Ранее в нашей лаборатории было показано, что замена Lys61Pro в ФДГ из *Mycobacterium vaccae* N10 (отличается от PseФДГ всего двумя аминокислотами в положениях 37 и 61) увеличивает термостабильность этого фермента до уровня PseФДГ [12]. Кроме того, эта замена не влияет на каталитические свойства. Таким образом, введение трех замен позволит снизить величину изоэлектрической точки нашего фермента с 5,2 до 4,9.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проекты № 11-04-00920-а и № 12-04-31740-мол-а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tishkov V.I., Popov V.O. // *Biomol. Eng.* 2006. **23**. P. 89.
2. Алексеева А.А., Савин С.С., Тишков В.И. // *Acta Naturae*. 2011. **3**. № 11. С. 39
3. Tishkov, V.I., Galkin, A.G., Marchenko, G.N., Tsygankov, Y.D., Egorov, A.M. // *Biotechnol. Appl. Biochem.* 1993. **18**. P. 201.
4. Filippova E.V., Polyakov K.M., Tikhonova T.V., Stekhanova T.N., Boiko K.M., Popov V.O. // *Crystallogr. Rep.* 2005. **50**. P. 796.
5. Filippova E.V., Polyakov K.M., Tikhonova T.V., Stekhanova T.N., Boiko K.M., Sadykhov E.G., Tishkov V.I., Popov, V.O., Labru, N. // *Crystallogr. Rep.* 2006. **51**. P. 663.
6. Tishkov V.I., Galkin A.G., Marchenko G.N., Egorova O.A., Sheluho D.V., Kulakova L.B., Dementieva L.A., Egorov A.M. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1993. **192**. P. 976.
7. Savin S.S., Tishkov V.I. // *Acta Naturae*. 2010. **2**. N 1(4). P. 78
8. Rojkova A.M., Galkin A.G., Kulakova L.B., Serov A.E., Savitsky P.A., Fedorchuk V.V., and Tishkov V.I. // *FEBS Lett.* 1999. **445**. P. 183.
9. Тишков В.И., Галкин А.Г., Гладышев В.Н., Карзанов В.В., Егоров А.М. // *Биотехнология*. 1992. № 5. С. 52.
10. Goncharenko K.V., Savin S.S., Tishkov V.I. // *Moscow Univ. Chem. Bul.* 2010. **65**. N 3. P. 131.

11. Tishkov, V.I., Matorin, A.D., Rojkova, A.M., Fedorchuk, V.V., Savitsky, P.A., Dementieva, L.A., Lamzin, V.S., Mezentzev, A.V., Popov, V.O. // FEBS Lett. 1996. **390**. P. 104.
12. Федорчук В.В., Галкин А.Г., Ясный И.Е., Кулакова Л.Б., Рожкова А.М., Филиппова А.А., Тишков В.И. // Биохимия. 2002. **67**. P. 1385.

Поступила в редакцию 15.11.13

CHANGE OF FORMATE DEHYDROGENASE ISOELECTRIC POINT BY RATIONAL DESIGN

A.A. Alekseeva^{1,3}, A.S. Petrov², V.V. Fedorchuk², E.A. Fedorchuk², T.A. Osipova², V.I. Tishkov^{1,2,3*}

¹A.N.Bach Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences, 119074 Moscow, Russia; ²Department of Chemical Enzymology, Chemistry Faculty, M.V. Lomonosov Moscow State University; 119991 Moscow, Russia; ³Innovations and High Technologies MSU Ltd, 109559 Moscow, Russia; *e-mail: vitishkov@gmail.com

Four new mutant forms of NAD⁺-dependent formate dehydrogenase (FDH, EC 1.2.1.2.) from bacterium *Pseudomonas* sp 101 with substitutions Lys112Pro, Lys231Ala, Lys231Ser and Lys317Asn were obtained to extend the pH optimum of stability by site-directed mutagenesis. The choice of the residues was based on amino acid alignment of FDHs from different sources and analysis of FDH three-dimensional structure. Kinetic properties and thermal stability were studied for all obtained mutant forms. It was revealed, that replacements in positions 112 and 231 lead to small improvement of kinetic properties, but at the same time the mutant form Lys317Asn showed the decrease of affinity with coenzyme. The study of thermal stability showed, that substitutions in positions 112 and 231 caused slightly destabilization effect, but replacement Lys317Asn caused the essential loss in thermal stability. The isoelectric point decreased for all mutant forms for about 0.1 unit.

Key words: formate dehydrogenase, *Pseudomonas* sp.101, protein engineering, rational design, isoelectric point.

Сведения об авторах: Алексеева Анастасия Александровна – науч. сотр. лаборатории молекулярной инженерии Института биохимии им. А.Н. Баха РАН, ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», канд. хим. наук; Петров Александр Сергеевич – аспирант кафедры химической энзимологии Химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова; Федорчук Владимир Витальевич – ст. науч. сотр. кафедры химической энзимологии МГУ имени М.В. Ломоносова, ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», канд. хим. наук; Федорчук Елена Александровна – мл. науч. сотр. кафедры химической энзимологии МГУ имени М.В. Ломоносова, ООО «Инновации и высокие технологии МГУ»; Осипова Татьяна Алексеевна – ст. науч. сотр. кафедры химической энзимологии МГУ имени М.В. Ломоносова, ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», канд. хим. наук; Тишков Владимир Иванович – профессор химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова; зав. лабораторией молекулярной инженерии Института биохимии им. А.Н. Баха РАН; ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», докт. хим. наук (vitishkov@gmail.com).