

УДК 577.151.03

## ВЛИЯНИЕ ПОЛОЖЕНИЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ HIS<sub>6</sub> НА ЭКСПРЕССИЮ И СВОЙСТВА ФЕНИЛАЦЕТОНМОНООКСИГЕНАЗЫ ИЗ *Thermobifida fusca*\*

© 2020 П.Д. Паршин<sup>1,2</sup>, А.А. Пометун<sup>1,2,3\*\*</sup>, У.А. Мартысюк<sup>4</sup>, С.Ю. Клейменов<sup>3,5</sup>,  
Д.Л. Агрошенко<sup>1,2,3</sup>, Е.В. Пометун<sup>6</sup>, С.С. Савин<sup>1,2,3</sup>, В.И. Тишков<sup>1,2,3\*\*</sup>

<sup>1</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет,  
119991 Москва, Россия; электронная почта: aapometun@gmail.com; vitishkov@gmail.com

<sup>2</sup> ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», 109551 Москва, Россия

<sup>3</sup> Институт биохимии имени А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр  
«Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, 119071 Москва, Россия

<sup>4</sup> Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева, 125047 Москва, Россия

<sup>5</sup> Институт биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН, 119334 Москва, Россия

<sup>6</sup> ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет),  
119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 23.03.2020

После доработки 27.03.2020

Принята к публикации 27.03.2020

Фенилацетонмонооксигеназа (КФ 1.14.13.92, РАМО) – фермент, катализирующий реакцию окисления кетонов до сложных эфиров с использованием молекулярного кислорода и NADPH. РАМО является перспективным ферментом для использования в биотехнологических процессах. Нами получены генетические конструкции с геном РАМО из *Thermobifida fusca*, в который были дополнительно введены нуклеотиды, кодирующие последовательность His<sub>6</sub> (His-tag) как на N-, так и на C-конце фермента (РАМО N и РАМО С соответственно). Также была получена описанная ранее РАМО L с His-tag, отделенным от C-конца дополнительным линкером KLGPEQKLISEEDLNSAVD. Все варианты РАМО экспрессировались в клетках *Escherichia coli* BL21(DE3) в активной форме, однако в случае РАМО N уровень экспрессии по сравнению с таковым для двух остальных форм был в 3–5 раз выше. Каталитические константы  $k_{cat}$  РАМО С и РАМО L совпадают с литературными данными для РАМО L, полученной в другой системе экспрессии. В случае РАМО N наблюдается небольшое (на 15%) уменьшение  $k_{cat}$ . Константы Михаэлиса по NADPH для всех форм РАМО в пределах погрешности совпадают с литературными данными для РАМО L, а  $K_M$  по бензил-ацетону была выше в несколько раз. Кинетика термоинактивации и дифференциальная сканирующая калориметрия показали большую (в 3–4 раза) температурную стабильность РАМО N по сравнению с вариантами фермента с His-tag на C-конце.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** фенилацетонмонооксигеназа, His-tag, экспрессия, каталитические свойства, термостабильность, дифференциальная сканирующая калориметрия

DOI: 10.31857/S0320972520050061

### ВВЕДЕНИЕ

Моноксигеназы Байера–Виллигера (ВМО) являются семейством ферментов, катализирующих большое количество окислительных реакций, которые затруднительно или невозможно провести с помощью классического органического синтеза. Кроме того, проведение реакции

Байера–Виллигера методами традиционной химии требует использования сильных окислителей – пероксидов, таких как 3-хлорпероксобензойная кислота или пероксотрифторуксусная кислота, что идет вразрез с принципами зеленой химии. Несмотря на то, что катализируемая реакция является окислительной, для проведения процесса ВМО требуется дополнительный ис-

Принятые сокращения: ДСК – дифференциальная сканирующая калориметрия, ИПТГ – изопропил-β-D-1-тио-галактопиранозид, РАМО – фенилацетонмонооксигеназа, ВМО – моноксигеназа Байера–Виллигера, FDH – формил-атдегидрогеназа.

\* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya>, в рубрике «Papers in Press», BM20-069, 12.05.2020.

\*\* Адресат для корреспонденции.

точник энергии в виде NADPH. Высокие регио- и энантиоселективность ВМОs делают их крайне привлекательными ферментами для использования в биотехнологических процессах [1].

Одним из главных недостатков монооксигеназ Байера–Виллигера является низкая стабильность, которая затрудняет их использование на практике. Клонированная в 2004 году ВМО из термофильной бактерии *Thermobifida fusca* лишена такого недостатка [2]. Данный фермент демонстрирует наибольшую каталитическую эффективность в реакции превращения фенилацетона в бензилацетат, из-за чего и был назван фенилацетонмонооксигеназой (РАМО, КФ 1.14.13.92). Для РАМО также характерна высокая каталитическая константа в процессах окисления бензилацетона и других схожих по структуре ароматических кетонов. Этот фермент может найти применение в процессах синтеза ароматизаторов, так как получающийся в результате реакции окисления бензилацетона эфир обладает ярко выраженным фруктовым запахом [2].

РАМО, как и большинство монооксигеназ Байера–Виллигера, содержит FAD и использует NADPH в качестве дополнительного источника энергии. РАМО является односубъединичным ферментом с молекулярной массой 62 kDa. Для него определена трехмерная кристаллическая структура [3]. Ранее для РАМО были описаны каталитические свойства [2], определен кинетический механизм [4] и исследовано влияние органических растворителей [5]. Также были предприняты попытки методом направленного мутагенеза изменить коферментную специфичность РАМО от NADPH к NADH из-за значительно меньшей стоимости последнего [6].

В большинстве работ для экспрессии РАМО используются генетические конструкции на основе векторов семейства pBAD, в которых целевые гены находятся под контролем арабинозного промотора [7]. Для получения высокоочищенных препаратов фермента на C-конец аминокислотной последовательности белка была введена аффинная метка из шести остатков гис-

тидина (His-tag). Для снижения влияния этой последовательности на свойства РАМО в векторе pBAD/мус-HisA, His-Tag отделен от C-конца фермента специальной последовательностью (эпитопом) из 19 аминокислотных остатков (вариант РАМО L) [2].

В данной работе для получения рекомбинантной РАМО нами была использована более простая система экспрессии, основанная на векторе pET28a и штамме *Escherichia coli* BL21(DE3). В этой системе индукция экспрессии происходит в присутствии лактозы или ее аналога – изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ). Для ускорения и упрощения очистки целевого фермента были созданы конструкции, в которых ген *ramo* содержал дополнительные нуклеотиды, кодирующие His-tag непосредственно на N- и C-концах аминокислотной последовательности фермента (варианты РАМО N и РАМО C соответственно). Кроме того, для корректного сравнения свойств новых ферментов с литературными данными нами на основе вектора pET28a была также получена конструкция, кодирующая вариант РАМО L.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Получение генетических конструкций.** Создание генетических конструкций проводили методом полимеразной цепной реакции. В качестве матрицы использовался ген *ramo*, синтезированный по нуклеотидной последовательности GenBank AAZ55526.1. Для получения конструкций с различным расположением His-tag использовали праймеры («Евроген», Россия), приведенные в табл. 1.

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили на амплификаторе T 100 Thermal Cycler («Bio-Rad», США). К раствору смеси праймеров (20 пмоль каждого) добавляли 2,5 мкл 10× буфера для ПЦР, поставляемого фирмой производителем вместе с ферментом, 1 мкл раствора MgCl<sub>2</sub> (25 мМ), 2 мкл раствора dNTP (2,5 мМ каждого), 1 мкл раствора геномной ДНК (50 нг/мкл),

Таблица 1. Последовательности праймеров, использованных в работе

Название праймера	5'–3' последовательность праймеров
РАМО_His For	5'-GCATATAGCCATGGGTCACCACCACCACCACCATTTCGGGTGCCGGGCAGACGACTG-3'
РАМО_For	5'-GCATATAGCCATGGCCGGGCAGACGACTGTCG-3'
РАМО_rev	5'-GGCCCAAGCTTTTACTAGGTGAGGACGAAACCTTCGTAGCC-3'
РАМО_Myc_Rev	5'-CCGCCTCGAGTTATCAATGATGATGATGATGGTTCGACGGCGCTATTTCAGATCCTC-3'
РАМО_His_Rev	5'-CCGCAAGCTTTTATCAATGATGATGATGATGATGCGAACCGGTGAGGACGAAACCTTC-3'

0,5 мкл (5 ед/мкл) Phusion ДНК-полимеразы («Thermo Fisher Scientific», США) и 17 мкл деионизованной воды до общего объема 25 мкл. ПЦР проводили по следующей схеме: 30 циклов (10 с при 98 °С, 10 с при 72 °С, 1,5 мин при 72 °С), далее элонгация 10 мин при 72 °С.

Продукты ПЦР очищали электрофорезом в 1%-ом агарозном геле и обрабатывали эндонуклеазами рестрикции NcoI и HindIII («Thermo Fisher Scientific», США) (для РАМО N и РАМО С) или NcoI и XhoI («Thermo Fisher Scientific», США) (для РАМО L). Затем ДНК очищали электрофорезом в 1% агарозном геле и лигировали с расщепленной теми же эндонуклеазами рестрикции плазмидой pET28a. После лигирования реакционной смесью трансформировали клетки *E. coli* DH5 $\alpha$  и высевали их на чашки Петри с агаризованной средой («Difco», Германия), содержащей канамицин (30 мкг/мл), и выдерживали 16 ч при 37 °С. Для каждой конструкции из чашки брали по три колонии и из них выделяли плазмиды. Для контроля полученных конструкций проводили секвенирование плазмидной ДНК в Центре коллективного пользования «Геном» (Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН).

**Экспрессия.** Для экспрессии ферментов проводили трансформацию плазмидной ДНК в штамм *E. coli* BL21(DE3). Колонии клеток штамма-производителя помещали в 4 мл среды LB («Difco», Германия), содержащую 30 мкг/мл канамицина и культивировали в течение ночи при 37 °С и 180 об./мин. Клетки из ночной культуры пересевали в 200 мл свежей среды ТВ (дрожжевой экстракт 24 г/литр, бактотриптон 12 г/литр (оба «Difco», Германия), глицерин 4 мл/литр, 0,017 М КН<sub>2</sub>Р<sub>4</sub>, 0,072 М К<sub>2</sub>НР<sub>4</sub>, рН 7,0) с аналогичной концентрацией канамицина. Клетки растили при 37 °С и 120 об./мин. По достижении поглощения  $A_{600} = 0,8$  добавляли ИПТГ до концентрации 200 мкМ. Экспрессию проводили в течение 24 или 7 ч при 120 об./мин и различных температурах (30 или 37 °С). Клетки осаждали центрифугированием на центрифуге Beckman J21 («Beckman», США) в течение 20 мин при 6000 об./мин и 4 °С. Осадок ресуспендировали в охлажденном буфере, содержащем 50 мМ Tris-HCl, 500 мМ NaCl и 20 мМ имидазол, рН 7,5.

**Выделение и очистка.** К суспензии клеток добавляли водный раствор FAD до конечной концентрации 10 мкМ. Разрушение клеток проводили на ультразвуковом дезинтеграторе Branson Sonifier 250 («Thermo Fisher Scientific», США) в течение 4–5 циклов по 90 с во льду с перерывами на охлаждение. Далее раствор инкубировали при 55 °С в течение 10 мин с последующим

осаждением дебриса на центрифуге Beckman J21 («Beckman», США) (40 мин, 10 000 об./мин, 4 °С). Бесклеточный экстракт наносили на колонку HisTrap HP («GE Healthcare Life Science», США) объемом 1 мл, уравновешенную буферным раствором 50 мМ Tris-HCl, 500 мМ NaCl, рН 7,5 содержащим 20 мМ имидазол, и смывали возрастающим линейным градиентом концентрации имидазола 20–500 мМ. Фракции, содержащие целевой белок, переводили в 50 мМ натрий-фосфатный буферный раствор, рН 7,5 с помощью гель-фильтрации на колонке, заполненной Сефадекс G-25 («Pharmacia Biotech», Швеция). За эффективностью очистки следили методом белкового электрофореза в денатурирующих условиях на приборе Mini Protean 2 («BioRad», Австрия) согласно протоколу фирмы производителя.

**Анализ препаратов РАМО с помощью MALDI-масс-спектрометрии.** При проведении данных исследований использовалось оборудование Центра коллективного пользования «Промышленные биотехнологии» Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

**Триптический гидролиз белка в полиакриламидном геле.** Из геля, окрашенного с помощью Coomassie Brilliant Blue, согласно протоколу фирмы («BioRad», Австрия), вырезали кусочек размером 3–4 мм<sup>3</sup> с полосой фермента, который для удаления красителя дважды промывали в 100 мкл 40% раствора ацетонитрила в 0,1М NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> в течение 20 мин при 37 °С. После удаления раствора, для дегидратации к гелю добавляли 100 мкл ацетонитрила. Для удаления ацетонитрила кусочек геля высушивали и затем к нему прибавляли 3,5 мкл раствора (15 мкг/мл) модифицированного трипсина («Promega», США) в 0,05 М NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>. Гидролиз проводили в течение 20 ч при 37 °С, затем к раствору добавляли 5,25 мкл 0,5% трифторуксусной кислоты (ТФУ) в 50% растворе водного ацетонитрила и тщательно перемешивали. Надгелевый раствор использовали для получения MALDI-масс-спектров.

Для подготовки образцов для масс-спектрометрии на мишени смешивали по 1,5 мкл раствора образца и 0,5 мкл раствора 2,5-дигидроксibenзойной кислоты (10 мг/мл в 20% водном ацетонитриле, 0,5% ТФУ) («Sigma», Германия). Полученную смесь высушивали на воздухе.

Масс-спектры были получены на MALDI-TOF/TOF масс-спектрометре Ultraflextreme («Bruker», Германия), оснащенном УФ лазером (Nd) в режиме положительных ионов с использованием рефлектрона. Точность измеренных

моноизотопных масс после докалибровки по пикам автолиза трипсина составляла 0,002–0,011% (20–110 ppm). Спектры получали в диапазоне масс 500–6500  $m/z$ , выбирая мощность лазера оптимальную для достижения наилучшего разрешения.

Идентификацию белков осуществляли при помощи программы Mascot ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)). Масс-спектры были обработаны с помощью программного пакета FlexAnalysis 3.3 («Bruker Daltonics», Германия). При помощи программы Mascot (опция «пептидный фингерпринт») провели поиск в локальной базе данных с указанной выше точностью, с учетом возможных модификаций: Acetyl (Protein N-term), Gln pyro-Glu (N-term Q), Oxidation (M), Propionamide (C). Кандидатные белки, имеющие параметры достоверности score >42 в базе данных NCBI, считали определенными надежно ( $p < 0,05$ ).

#### Определение каталитических параметров.

Концентрацию активных центров фермента определяли на спектрофотометре Shimadzu 1800PC («Shimadzu GmbH», Германия) по поглощению FAD при 441 нм ( $\varepsilon = 12,4 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). Раствор РАМО перед измерениями инкубировали при 55 °С в течение 10 мин. За протеканием реакции следили при 30 °С по расходу NADPH, измеряя уменьшение поглощения при 340 нм. Объем реакционной среды составлял 1 мл. Для измерений использовался 50 мМ натрий-фосфатный буфер pH 7,5, содержащий 50 мкМ NADPH и 10 мМ бензилацетон. Для определения  $K_M$  концентрации NADPH и бензилацетона варьировали в диапазоне 5–500 мкМ и 0,25–15 мМ соответственно.

**Изучение кинетики термоинактивации.** Термостабильность ферментов измеряли в 0,05 М натрий-фосфатном буфере, pH 7,5 при нескольких температурах. 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) («Waters», США). 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 («Eppendorf», Германия). Остаточную активность РАМО измеряли, как описано выше. 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» («OriginLab Corporation», США).

#### Изучение термостабильности с помощью ДСК.

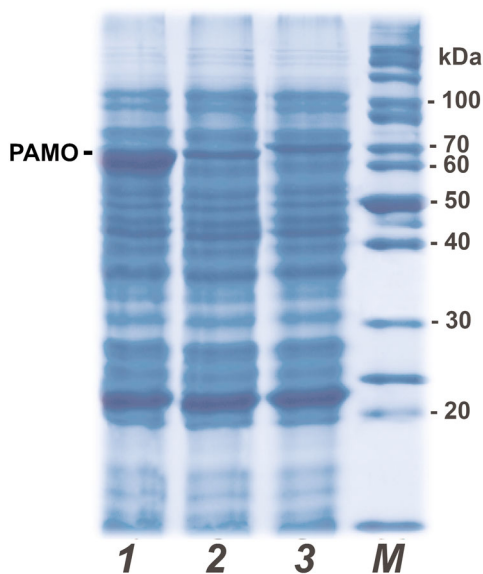
Эксперименты по определению зависимости теплоемкости от температуры для полученных РАМО проводили на дифференциальном адиабатическом сканирующем микрокалориметре MicroCal VP DSC («Malvern Panalytical Ltd», Великобритания). Рабочий объем капиллярных калориметрических ячеек из тантала составлял 140 мкл. Для предотвращения образования пузырьков и закипания растворов при повышении температуры в ячейках калориметра поддерживалось избыточное давление 3 атм. Калибровку прибора осуществляли путем подачи на одну ячейку фиксированной мощности (25 мкВт). Перед проведением калориметрического эксперимента определяли инструментальную базовую линию. При измерениях в контрольную ячейку помещали буферный раствор, а в рабочую – раствор исследуемой РАМО. Концентрация ферментов составляла 1 мг/мл, а скорость прогрева – 1 град./мин.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

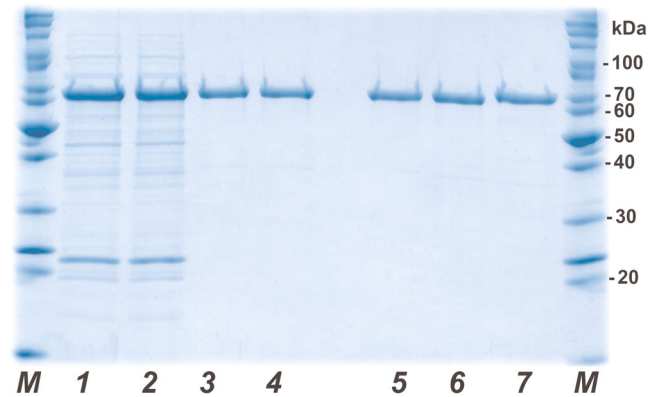
**Экспрессия, выделение и очистка.** Металл-хелатная аффинная хроматография является одним из наиболее эффективных методов очистки белков и на данный момент широко используется во всем мире. Для ее проведения необходимо наличие на *N*- или *C*-конце белка последовательности из 6–12 остатков гистидина (His-tag) [8]. Несмотря на значительное упрощение процесса очистки, введение His-tag может приводить к существенному изменению (и даже ухудшению) свойств белка, что было показано на ферментах самой разной природы [9–12]. Поэтому для каждого фермента необходимо определить влияние введения His-tag на каталитические свойства и стабильность. В нашей работе была поставлена задача получения конструкций РАМО с расположением His-tag на *N*- и *C*-концах аминокислотной последовательности (РАМО N и РАМО C соответственно) и сравнения свойств модифицированных ферментов. Для корректного сравнения полученных данных ранее нами также была получена описанная конструкция РАМО L, в которой His-tag отделен от *C*-конца фермента дополнительной аминокислотной последовательностью из 19 а.о. [2]. Как уже указывалось выше, плазмиды с тремя вариантами РАМО были получены с помощью ПЦР. Их секвенирование показало отсутствие каких-либо посторонних нуклеотидных замен.



В своей работе мы отказались от использования систем, в которых экспрессия целевого гена находится под контролем арабинозного промотора в силу высокой стоимости индуктора L-арабинозы. Для получения рекомбинантных РАМО была использована более дешевая система на основе вектора рЕТ28а и клеток *E. coli* BL21(DE3). В этой системе экспрессия целевого фермента индуцируется под действием ИПТГ или значительно более дешевой лактозы. Для оптимизации условий экспрессии РАМО варьировали питательную среду, концентрацию индуктора ИПТГ, время и температуру культивирования. Наибольший выход фермента был достигнут при экспрессии в течение 24 ч в среде ТВ при 30 °С и индукции действием 0,2 мМ ИПТГ. Повышение температуры до 37 °С приводило к преждевременному лизису клеток. Уменьшение времени экспрессии до 8 ч и использование среды 2YT также приводили к меньшему выходу фермента. Следует отметить, что изменение условий культивирования абсолютно одинаково влияло на уровень экспрессии всех трех вариантов РАМО, однако во всех экспериментах при одинаковых условиях уровень экспрессии фермента с His-tag на N-конце аминокислотной последовательности был в 3–5 раз больше, чем таковой для РАМО С и РАМО L (рис. 1). На рис. 1 также хорошо видно, что из-за наличия дополнительных 19 а.о. РАМО L (дорожка 3) имеет большую молекулярную массу по сравнению с РАМО N и РАМО С (дорожки 1 и 2).



**Рис. 1.** Аналитический электрофорез в денатурирующих условиях проб биомассы клеток *E. coli* после экспрессии. 1 – РАМО N, 2 – РАМО С, 3 – РАМО L, M – маркер молекулярных масс



**Рис. 2.** Аналитический электрофорез в денатурирующих условиях проб на разных стадиях очистки. M – маркер молекулярных масс, РАМО N – лизат клеток (1), лизат после термообработки (2), после метало-хелатной хроматографии (3) и после обессоливания (4). Дорожки 5–7 – РАМО N, РАМО С и РАМО L после всех стадий очистки

Очистка содержащих His-tag РАМО была проведена с помощью металл-хелатной аффинной хроматографии. На рис. 2 представлены данные аналитического электрофореза в денатурирующих условиях для препаратов РАМО N на разных стадиях очистки (дорожки 1–4) и для очищенных препаратов всех трех форм (дорожки 5–7). Из рис. 2 видно, что все три формы РАМО с His-tag могут быть получены в практически гомогенном виде в одну стадию. Для подтверждения аутентичности целевых белков препараты ферментов были выделены из геля и проанализировали с помощью MALDI-TOF/TOF масс-спектрометрии. Результаты анализа показали, что при экспрессии в клетках *E. coli* во всех трех случаях не происходит посттрансляционной модификации наших ферментов, и последовательности His-tag расположены в полном соответствии с последовательностями, кодируемыми генетическими конструкциями.

Было обнаружено, что все три варианта РАМО в ходе очистки теряют часть связанного FAD, однако, после инкубации со свободным FAD фермент восстанавливает свою активность. Успешное связывание фермента с FAD подтверждается спектром препарата фермента после обессоливания для отделения от несвязавшегося FAD (рис. 3).

**Кинетические свойства.** В табл. 2 представлены кинетические параметры РАМО с разными положениями аффинной метки. Полученные данные свидетельствуют о том, что положение His-tag не оказывает существенного влияния на каталитические параметры фермента. В случае РАМО с His-tag на N-конце величина каталитической константы немного меньше, но это раз-

**Таблица 2.** Кинетические параметры трех вариантов РАМО с различным расположением His-tag (50 мкМ Tris-HCl, pH 7,5, 30 °С)

Фермент	$K_M^{NADPH}$ , мкМ	$K_M^{benzylacetone}$ , мМ	$k_{cat}$ , с <sup>-1</sup>	Источник данных
РАМО N	3,2 ± 0,4	7,1 ± 0,6	1,5 ± 0,2	Настоящая работа
РАМО С	4,2 ± 0,7	5,5 ± 0,6	1,8 ± 0,2	Настоящая работа
РАМО L	4,4 ± 0,9	6,4 ± 0,5	1,9 ± 0,2	Настоящая работа
РАМО L (pBAD)	3,0	0,36	1,8	[2]

личие находится в пределах ошибки эксперимента. Константы Михаэлиса для NADPH также в пределах погрешности совпадают с данными для РАМО L, полученной в другой системе экспрессии [2]. Однако для всех трех полученных нами ферментов величина  $K_M$  по бензил-ацетону была в несколько раз выше по сравнению с литературными данными [2]. Также отметим, что активность всех трех форм фермента линейно зависела от его концентрации.

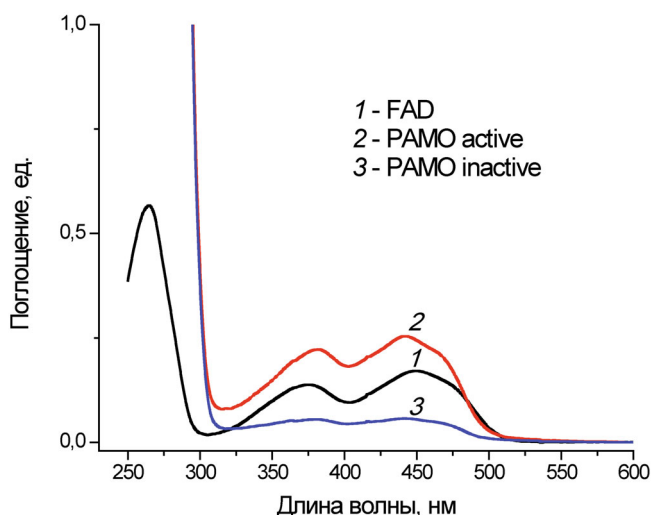
**Термостабильность.** На рис. 4 в полулогарифмических координатах представлены зависимости изменения остаточной активности от времени для полученных РАМО при 59 °С. Линейный характер наблюдаемых зависимостей свидетельствует, что термоинактивация протекает в соответствии с кинетикой реакции первого порядка. Из тангенса угла наклона прямых были рассчитаны эффективные константы скорости термоинактивации ферментов ( $k_{in}$ ). В случае РАМО N, наблюдаемая при 59 °С  $k_{in}$  в 3–4 раза ниже по сравнению с константами скорости

инактивации для двух форм фермента, содержащих His-tag на С-конце.

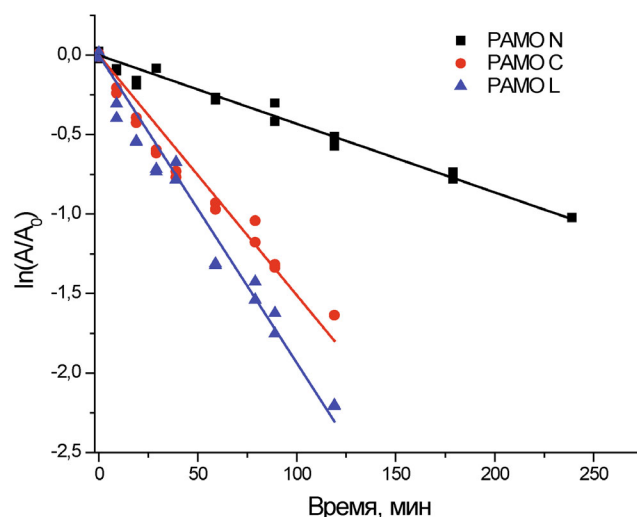
Результаты исследования кинетики термоинактивации согласуются с данными, полученными дифференциальной сканирующей калориметрией (рис. 5). Как видно из рис. 5, в случае РАМО N температура плавления белковой глобулы на 1 градус выше по сравнению с двумя другими ферментами. Принимая во внимание, что в среднем константа скорости термоинактивации белков увеличивается в 10 раз на каждые три градуса, то разница в температурах плавления в один градус как раз и согласуется с наблюдаемыми для разных форм РАМО различиями в значениях наблюдаемых констант скорости термоинактивации.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

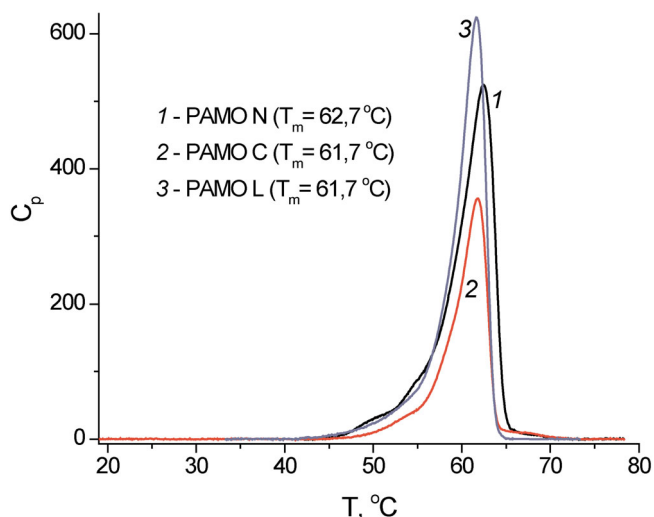
Как уже указывалось выше, NAD(P)<sup>+</sup>-зависимые оксидоредуктазы являются высокоэф-



**Рис. 3.** Спектры поглощения свободного FAD (1) и РАМО до и после добавления FAD (3 и 2 соответственно). 0,05 М натрий-фосфатный буфер, pH 7,5. (С цветным вариантом рис. 3–6 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>)



**Рис. 4.** Зависимости натурального логарифма остаточной активности от времени для трех вариантов РАМО при 59 °С (0,05 М натрий-фосфатный буфер, pH 7,5)



**Рис. 5.** Кривые плавления для трех вариантов РАМО с различным расположением His-tag (0,05 М натрий-фосфатный буфер, рН 7,5; концентрация ферментов 0,7–1,0 мг/мл, скорость сканирования 1 град./мин)

фективными ферментами, которые позволяют практически с количественным выходом и оптической чистотой >99% получать соединения, которые невозможно получить с помощью методов традиционной органической химии. Однако, в силу очень высокой стоимости восстановленного кофермента NAD(P)H, для экономически оправданного применения таких ферментов на практике необходимо использовать вторую дополнительную реакцию, в результате которой кофермент из окисленной формы вновь возвращается в восстановленную. Одним из ферментов, которые нашли широкое применение для регенерации восстановленного кофермента является форматдегидрогеназа (FDH). Первый биокаталитический процесс получения  $\epsilon$ -капролактонов по реакции Байера–Виллигера с участием циклогексанонмонооксигеназы с ферментативной регенерацией восстановленного кофермента был описан в 1997 году [13, 14]. Для восстановления NADP<sup>+</sup> в NADPH использовали мутантные FDH из бактерий *Pseudomonas* sp. 101 (NP-PseFDH), у которых с помощью белковой инженерии коферментная специфичность была изменена от NAD<sup>+</sup> к NADP<sup>+</sup> [15–17].

Производительность системы из двух растворимых биокатализаторов ограничена по каталитическим свойствам отдельных ферментов. Поэтому для общего повышения эффективности биокатализа в последнее время очень популярно создание химерных белков, в которых два фермента, катализирующие сопряженные реакции, объединены в одну полипептидную цепь. Сближение двух активных центров в одной гло-

буле часто приводит к тому, что такие биокатализаторы в несколько раз более эффективны, чем смесь отдельных ферментов. Данная работа является частью нашего большого проекта по созданию таких новых химерных биокатализаторов, включая слитый фермент на основе мутантных NADP<sup>+</sup>-специфичных FDH из бактерий *Pseudomonas* sp. 101 и РАМО. Ранее нами было показано, что в случае PseFDH наиболее оптимальным является присоединение дополнительного полипептида к N-концу фермента [18], т.е. логичным является получение слитого фермента в последовательности РАМО-PseFDH. Для очистки такого гибридного белка His-tag должен находиться на N-конце РАМО. Поскольку в литературе информация о РАМО N отсутствует, было решено получить и изучить такой фермент. Кроме того, было интересно выяснить насколько необходим дополнительный пептид между C-концом РАМО и His-tag, который был предложен другими авторами ранее [2]. Результаты наших экспериментов в очередной раз подтвердили, что при введении аффинной метки необходимо проведение отдельных исследований по изучению влияния His-tag на N- или C-конец аминокислотной последовательности фермента. В случае РАМО оказалось, что аффинная метка очень слабо влияет на каталитические свойства фермента (в пределах ошибки эксперимента константы практически одинаковы). Отсутствие влияния положения His-tag в белковой глобуле на каталитические свойства РАМО согласуется с данными рентгеноструктурного анализа [3]. На рис. 6, а представлена экспериментальная структура фермента (PDB 1W4X) с указанием положения N- и C-концов. Из рисунка хорошо видно, что N- и C-концы аминокислотной последовательности РАМО расположены вдали как от центров связывания изоаллоксазинового кольца FAD и NADPH, так и от центра связывания субстрата. Причина расхождения значений  $K_M$  по бензил-ацетону для полученных нами ферментов с данными для РАМО L, полученной в другой системе экспрессии, на настоящий момент остается невыясненной. Хотя система экспрессии и может оказывать влияние на эффективность фолдинга и пространственную структуру белка, такое избирательное ухудшение только одного параметра объяснить сложно. Для этого требуются дополнительные эксперименты и изучение реакции РАМО с бензилацетоном методом газовой хроматографии.

В то же время введение His-tag на N-конец РАМО положительно влияет как на уровень экспрессии фермента в клетках *E. coli*, так и на термостабильность, что является абсолютно не-



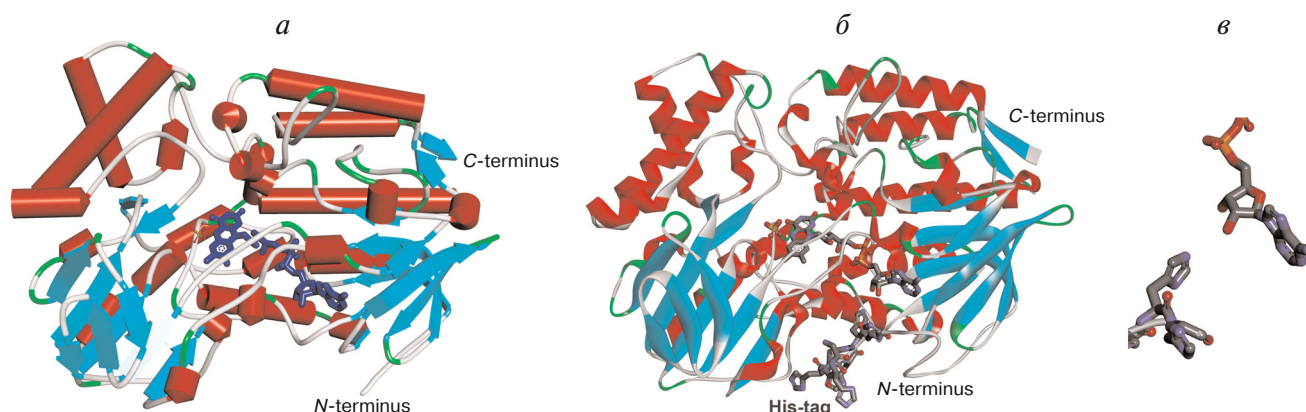


Рис. 6. *а* – Экспериментальная трехмерная структура РАМО PDB 1W4X с указанием положения *N*- и *C*-концов фермента. *б* – Модельная структура РАМО N с достроенными 10-ю а.о. и His-tag. *в* – Взаимная ориентация адениновой части FAD и пятого остатка гистидина из His-tag

ожиданным. В обоих случаях наблюдается увеличение показателя в 3–5 раз. Одним из возможных объяснений большего уровня экспрессии фермента с His-tag на *N*-конце аминокислотной последовательности является более оптимальная для экспрессии в клетках *E. coli* частота встречаемости кодонов, кодирующих остатки гистидина по сравнению с таковой для кодонов, кодирующими а.о. *N*-конца самого фермента. Однако разница в частоте встречаемости кодонов не такая значительная, чтобы объяснить наблюдаемое увеличение уровня экспрессии. Тем не менее увеличение экспрессии в 3–5 раз является важным фактором для практического применения РАМО.

Более высокая термостабильность РАМО N по сравнению с вариантами с His<sub>6</sub> на *C*-конце может быть связана с изменением структуры *N*-конца после введения в него His-tag. Данные рентгеноструктурного анализа свидетельствуют, что *N*-конец РАМО дикого типа очень подвижен и в кристаллической структуре полипептидная цепь видна только начиная с 10-го остатка [3], в то время как *C*-конец хорошо структурирован. Это очень хорошо видно на рис. 6, *а*. Литературные данные [2] и результаты нашей работы свидетельствуют, что FAD не очень прочно связан в активном центре. Поэтому одним из наиболее вероятных механизмов термоинактивации РАМО может быть диссоциация кофактора из активного центра фермента. На высокую вероятность такого механизма указывает тот факт, что адениновая часть кофактора экспонирована в раствор (рис. 6). Нами была построена модельная структура РАМО N, в которой добавлены недостающие в экспериментальной структуре на *N*-конце 10 а.о., а также собственно последовательность His-tag (рис 6, *б*). Методология моделирования и оптимизация

структуры подробно описаны в нашей работе по введению His-tag в PseFDH [18]. Анализ модельной структуры РАМО N (рис. 6, *б*) свидетельствует, что *N*-конец РАМО N с положительно заряженным His-tag может быть пространственно сближен с адениновой частью FAD. Данные моделирования свидетельствуют, что электростатическое взаимодействие между имидазолами His-tag и отрицательно заряженной пирофосфатной частью FAD невозможно из-за стерических ограничений, однако имидазол пятого остатка гистидина из His-tag образует водородную связь с 3'- и частично с 2'-ОН группами рибозы аденозина (рис 6, *в*). По-видимому, возникновение такой связи приводит к структуризации *N*-конца и, как следствие, к повышению термостабильности. Отметим, что величина стабилизирующего эффекта примерно соответствует энергии образующейся связи. В то же время наличие дополнительного пептида между *C*-концом РАМО и His<sub>6</sub> в РАМО L уменьшает структурирование этого конца и, как результат, стабильность РАМО L оказывается меньше, чем РАМО С (рис. 4).

На основании данных о положительном влиянии введения His-tag на *N*-конец РАМО нами уже начаты эксперименты по созданию и изучению свойств слитых гибридных ферментов РАМО с NP PseFDH. Данные этих экспериментов вскоре будут опубликованы.

**Финансирование.** Исследование выполнено при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований и Правительства Москвы в рамках научного проекта № 19-34-70036. При проведении исследований использовалось оборудование Центра коллективного пользования «Геном» Института мо-



лекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН и Центра коллективного пользования «Промышленные биотехнологии» Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Kamerbeek, N. M., Janssen, D. B., van Berkel, W. J. H., and Fraaije, M. W. (2003) Baeyer–Villiger monoxygenases, an emerging family of flavin-dependent biocatalysts, *Adv. Synth. Catal.*, **345**, 667–678, doi: 10.1002/adsc.200303014.
- Fraaije, M. W., Wu, J., Heuts, D. P. H. M., Van Hellemond, E. W., Spelberg, J. H. L., and Janssen, D. B. (2005) Discovery of a thermostable Baeyer–Villiger monoxygenase by genome mining, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **66**, 393–400, doi: 10.1007/s00253-004-1749-5.
- Malito, E., Alfieri, A., Fraaije, M. W., and Mattevi, A. (2004) Crystal structure of a Baeyer–Villiger monoxygenase, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **101**, 13157–13162, doi: 10.1073/pnas.0404538101.
- Torres Pazmiño, D. E., Baas, B. J., Janssen, D. B., and Fraaije, M. W. (2008) Kinetic mechanism of phenylacetone monoxygenase from *Thermobifida fusca*, *Biochemistry*, **47**, 4082–4093, doi: 10.1021/bi702296k.
- Secundo, F., Fialà, S., Fraaije, M. W., De Gonzalo, G., Meli, M., Zambianchi, F., and Ottolina, G. (2011) Effects of water miscible organic solvents on the activity and conformation of the Baeyer–Villiger monoxygenases from *Thermobifida fusca* and *Acinetobacter calcoaceticus*: a comparative study, *Biotechnol. Bioeng.*, **108**, 491–499, doi: 10.1002/bit.22963.
- Jensen, C. N., Ali, S. T., Allen, M. J., and Grogan, G. (2013) Mutations of an NAD(P)H-dependent flavoprotein monoxygenase that influence cofactor promiscuity and enantioselectivity, *FEBS Open Bio*, **3**, 473–478, doi: 10.1016/j.fob.2013.09.008.
- Van Bloois, E., Dudek, H. M., Duetz, W. A., and Fraaije, M. W. (2012) A stepwise approach for the reproducible optimization of PAMO expression in *Escherichia coli* for whole-cell biocatalysis, *BMC Biotechnol.*, **12**, 12–31, doi: 10.1186/1472-6750-12-31.
- Arnau, J., Lauritzen, C., Petersen, G. E., and Pedersen, J. (2006) Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins, *Protein Expr. Purif.*, **48**, 1–13, doi: 10.1016/j.pep.2005.12.002.
- Zhao, D., and Huang, Z. (2016) Effect of His-tag on expression, purification, and structure of zinc finger protein, ZNF191(243–368), *Bioinorg. Chem. Appl.*, **2016**, 8206854, doi: 10.1155/2016/8206854.
- 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’Oronzo, E., Facheris, S., Secundo, F., and Savin, S. S. (2018) Rational design of practically important enzymes, *Moscow Univ. Chem. Bull.*, **73**, 1–6, doi: 10.3103/S0027131418020153.
- Booth, W. T., Schlachter, C. R., Pote, S., Ussin, N., Mank, N. J., Klapper, V., Offermann, L. R., Tang, C., Hurlburt, B. K., and Chruszcz, M. (2018) Impact of an N-terminal polyhistidine tag on protein thermal stability, *ACS Omega*, **3**, 760–768, doi: 10.1021/acsomega.7b01598.
- Esen, H., Alpdağtaş, S., Mervan Çakar, M., and Binay, B. (2019) Tailoring of recombinant FDH: effect of histidine tag location on solubility and catalytic properties of *Chaetomium thermophilum* formate dehydrogenase (CtFDH), *Prep. Biochem. Biotechnol.*, **49**, 529–534, doi: 10.1080/10826068.2019.1599394.
- Rissom, S., Schwarz-Linek, U., Vogel, M., Tishkov, V. I., and Kragl, U. (1997) Synthesis of chiral  $\epsilon$ -lactones in a two-enzyme system of cyclohexanone monoxygenase and formate dehydrogenase with integrated bubble-free aeration, *Tetrahedron Asymmetry*, **8**, 2523–2526, doi: 10.1016/S0957-4166(97)00311-X.
- Schwarz-Linek, U., Krödel, A., Ludwig, F.-A., Schulze, A., Rissom, S., Kragl, U., Tishkov, V. I., and Vogel, M. (2001) Synthesis of natural product precursors by Baeyer–Villiger oxidation with cyclohexanone monoxygenase from *Acinetobacter*, *Synthesis*, **33**, 947–951, doi: 10.1055/s-2001-13394.
- Тишков В. И. (1993) *Структура, механизм действия и белковая инженерия NAD<sup>+</sup>-зависимой форматдегидрогеназы*, Дис. докт. хим. наук, МГУ, Москва.
- Tishkov, V. I., Galkin, A. G., Fedorchuk, V. V., Savitsky, P. A., Rojkova, A. M., Gieren, H., and Kula, M.-R. (1999) Pilot scale production and isolation of recombinant NAD<sup>+</sup>- and NADP<sup>+</sup>-specific formate dehydrogenase, *Biotechnol. Bioeng.*, **64**, 187–193.
- Serov, A. E., Popova, A. S., Fedorchuk, V. V., and Tishkov, V. I. (2002) Engineering of coenzyme specificity of formate dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochem. J.*, **367**, 841–847, doi: 10.1042/BJ20020379.
- Пометун А. А., Паршин П. Д., Галаничева Н. П., Упоров И. В., Атрошенко Д. Л., Савин С. С., Тишков В. И. (2020) Влияние последовательности His<sub>6</sub> на свойства форматдегидрогеназы из бактерий *Pseudomonas* sp. 101, *Вестник МГУ, Сер. 2: Химия*, **61**, 317–325.

**INFLUENCE OF POSITION OF HIS<sub>6</sub>-SEQUENCE ON EXPRESSION AND PROPERTIES OF PHENYLACETONE MONOOXYGENASE FROM *Thermobifida fusca*\***

**P. D. Parshin<sup>1,2</sup>, A. A. Pometun<sup>1,2,3\*\*</sup>, U. A. Martysuk<sup>4</sup>, S. Yu. Kleymenov<sup>3,5</sup>,  
D. L. Atroshenko<sup>1,2,3</sup>, E. V. Pometun<sup>6</sup>, S. S. Savin<sup>1,2,3</sup>, and V. I. Tishkov<sup>1,2,3\*\*</sup>**

<sup>1</sup> *Lomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry, 119234 Moscow, Russia;  
E-mail: aapometun@gmail.com; vitishkov@gmail.com*

<sup>2</sup> *Innovations and High Technologies MSU Ltd, 109551 Moscow, Russia*

<sup>3</sup> *Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology  
of the Russian Academy of Sciences, 119071 Moscow, Russia*

<sup>4</sup> *Dmitry Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, 125047 Moscow, Russia*

<sup>5</sup> *Koltzov Institute of Developmental Biology of Russian Academy of Sciences, 119334 Moscow, Russia*

<sup>6</sup> *Sechenov First Moscow State Medical University, 119991 Moscow, Russia*

Received March 23, 2020

Revised March 27, 2020

Accepted March 27, 2020

Phenylacetone monooxygenase (EC 1.14.13.92, PAMO) is an enzyme catalyzing ketone oxidation with molecular oxygen and NADPH to yield esters. PAMO is a promising enzyme for biotechnological processes. In this work, genetic constructs based on PAMO gene from *Thermobifida fusca*, containing N- and C-terminal His-tags (His<sub>6</sub> sequence), e.g. PAMO N and PAMO C, respectively, were generated as well as PAMO L construct with His-tag attached to the enzyme C-terminus via a 19 a.a. spacer. All PAMO variants were expressed in active form in *Escherichia coli* BL21(DE3) cells, however, the PAMO N expression level was 3-5-fold higher than for the other variants. Catalytic constants ( $k_{cat}$ ) determined for PAMO C and PAMO L agreed with those published for PAMO L produced in a different expression system. For PAMO N, a small decrease (15%) in  $k_{cat}$  was observed. The values of Michaelis constants for NADPH for all PAMO variants were in agreement within the experimental error with the literature data for PAMO L, but  $K_M$  for benzyl acetone was several times higher. Thermal inactivation kinetics and differential scanning calorimetry demonstrated a 3- to 4-fold higher thermal stability for PAMO N compared to the enzyme variants with C-terminal His-tag.

**Keywords:** phenylacetone monooxygenase, His-tag, gene expression, mutagenesis, catalytic properties, temperature stability