УДК 548.73

ВЫСОКОАКТИВНАЯ РЕКОМБИНАНТНАЯ ФОРМИАТДЕГИДРОГЕНАЗА ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ Staphylococcus aureus: ПОЛУЧЕНИЕ И КРИСТАЛЛИЗАЦИЯ*

© 2020 А.А. Пометун^{1,2,3#}, К.М. Бойко^{2#}, Т.С. Юрченко^{1,3}, А.Ю. Николаева^{2,4}, И.С. Каргов^{2,3}, Д.Л. Атрошенко^{1,2,3}, С.С. Савин^{1,2,3}, В.О. Попов^{2,4}, В.И. Тишков^{1,2,3**}

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

² Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, 119071 Москва, Россия

³ ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», 109559 Москва, Россия

⁴ НИЦ «Курчатовский институт», 123182 Москва, Россия

Поступила в редакцию 16.04.2020 После доработки 02.05.2020 Принята к публикации 02.05.2020

NAD⁺-зависимая формиатдегидрогеназа бактерий *Staphylococcus aureus* (SauFDH) является одним из ключевых ферментов, отвечающих за выживание этого патогена в условиях биопленок. Высокоселективные ингибиторы SauFDH могут быть использованы в качестве антибактериального препарата именно против биопленок *S. aureus*. Наиболее перспективным путем является поиск таких ингибиторов на основе трехмерной структуры фермента. Проведено культивирование штамма *E. coli* – суперпродуцента рекомбинантной SauFDH с выходом 1 г целевого белка с литра среды. Разработана и оптимизирована процедура выделения и очистки, позволившая получить 400 мг гомогенного фермента с выходом 61%. Показано, что SauFDH имеет самую высокую удельную активность 20 ед. на мг белка, что в два раза выше по сравнению с таковой для всех описанных формиатдегидрогеназ. Проведено два цикла поиска и оптимизации условий кристаллизации. В результате для апо- и холо-форм SauFDH получены кристаллы размером 200 и 40 мкм соответственно. Проведен сбор наборов дифракционных данных, определены пространственные группы и параметры элементарных ячеек. Кристаллы апо- и холо-форм SauFDH, которые дифрагировали до разрешения 2,2 и 2,7 Å соответственно, принадлежали к разным пространственным группам, что может свидетельствовать о связывании кофактора в случае холо-формы фермента.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: формиатдегидрогеназа, *Staphylococcus aureus*, экспрессия, очистка, кристаллизация, рентгеноструктурный анализ.

DOI: 10.31857/S0320972520060068

ВВЕДЕНИЕ

NAD⁺-зависимая формиатдегидрогеназа (FDH) найдена в бактериях, дрожжах, микроскопических грибах и растениях. Основная физиологическая роль фермента в патогенных микроорганизмах и растениях заключается в снабжении клетки энергией в виде восстановленного кофермента NADH в условиях стресса. Активное развитие методов высокопродуктивного секвенирования привело к тому, что в базах данных появились последовательности геномов большого количества патогенов. Гены формиатдегидрогеназы были аннотированы практически во всех геномах патогенных бактерий и дрожжей [1-3], включая и Staphylococcus aureus (SauFDH). S. aureus является одним из наиболее опасных патогенов человека и может вызывать широкий диапазон заболеваний, включая пневмонию, инфекционно-токсический шок, сепсис и др. Данный патоген также является одной из наиболее частых причин госпитальных инфекций. Стафилококки представляют особую опасность при росте в виде биопленок, поскольку в этом состоянии у них резко возрастает резистентность к традиционным антибактериаль-

Принятые сокращения: SauFDH, PseFDH – формиатдегидрогеназы из бактерий *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas* sp. 101 соответственно.

^{*} Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) http://protein.bio. msu.ru/biokhimiya, в рубрике «Papers in Press», BM20-094, 29.05.2020.

^{**} Адресат для корреспонденции.

[#] Авторы внесли равный вклад в работу.

ным агентам. Результаты транскриптомного анализа [4] показали, что в биопленках S. aureus по сравнению с ростом патогена в виде планктона уровень экспрессии SauFDH возрастает в 20 раз и более, а общее количество ее мРНК находится на третьем месте среди мРНК остальных белков и ферментов [4]. Таким образом, SauFDH является ключевым ферментом для выживания S. aureus в виде биопленок. В связи с этим данный фермент представляется перспективной мишенью для борьбы именно с биопленками стафилококков. Однако для целенаправленного поиска высокоспецифичных ингибиторов SauFDH необходимо установить пространственную структуру фермента (т.н. structurebased drug design).

SauFDH представляет большой интерес и с точки зрения фундаментальной энзимологии. NAD⁺-зависимая формиатдегидрогеназа, состоящая из двух идентичных полипептидных цепей и не содержащая в своем составе других дополнительных групп, является высококонсервативным ферментом. Внутри одного семейства (бактерии, дрожжи, растения) уровень гомологии между аминокислотными последовательностями таких формиатдегидрогеназ составляет более 80%, в то время как гомология SauFDH с другими бактериальными формиатдегирогеназами (включая и другие патогеные бактерии) составляет всего 40% [2, 3]. Поэтому исследование такого фермента представляет несомненный наvчный интерес.

В нашей лаборатории ген *saufdh* был клонирован в плазмиду pET23a, и было показано, что в клетках *E. coli* рекомбинантная SauFDH экспрессируется в активной форме [5]. В данной работе была разработана и оптимизирована методика выделения фермента, что позволило получить достаточное количество для поиска и оптимизации условий кристаллизации, и получения предварительных данных о структуре SauFDH как в свободной форме, так и в комплексе с коферментом (апо- и холо- формы соответственно).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспрессия SauFDH в клетках *E. coli*. Для получения штамма-продуцента проводили трансформацию клеток *E. coli* BL21(DE3) CodonPlus/pLysS плазмидой pSauFDH, полученной клонированием гена *saufdh* в плазмиду pET23a. Единичную колонию с чашки Петри помещали в пробирку с 4 мл среды 2YT (16 г/л бактотриптона, 10 г/л дрожжевого экстракта («Difco», США), NaCl 5 г/л, pH 7,0), содержащую антибиотики хлорамфеникол (25 мкг/мл) и ампициллин (150 мкг/мл), и культивировали на качалке при 37 °С и 180 об/мин в течение 12 ч. Ночную культуру пересевали в колбу с отбойниками (общий объем 500 мл, объем среды 60 мл), разбавляли в 1000 раз (60 мкл посевного материала, 60 мл среды 2ҮТ, с хлорамфениколом (25 мкг/мл) и ампициллином 150 мкг/мл) и культивировали на качалке при температуре 37 °C, 120 об/мин. При достижении величины поглощения среды, на 600 нм (А₆₀₀) значения 0,6-0,8, содержимое колбы делили на три равные части по 20 мл и переносили в три однолитровые колбы с отбойниками, содержащими 180 мл среды 2ҮТ без добавления антибиотиков, и культивировали при 30 °С и 120 об/мин. Далее при величине поглощения А₆₀₀ 0,6-0,8 проводили индукцию, добавляя в среду для культивирования раствор лактозы (300 г/л) до конечной концентрации индуктора (20 г/л), снижали температуру до 20 °С и продолжали культивирование до утра (20 °C, 120 об/мин). Утром клетки осаждали на центрифуге фирмы Beckman J-21 («Beckman», США) в течение 20 мин при 5000 об/мин, 4 °С (стаканы 250 мл, ротор J14).

Выделение и очистка SauFDH. Полученную биомассу ресуспендировали в 0,1 М Na-фосфатном буфере, pH 8,0 (концентрация клеток 10 вес %) и замораживали при -20 °С. После разморозки клетки разрушали на ультразвуковом дезинтеграторе Branson Ultrasonic 250 («Branson», США). Полученную суспензию без центрифугирования подвергали термообработке в течение 20 мин при 55 °C. Далее раствор оставляли при комнатной температуре на 30 мин и осаждали дебрис центрифугированием клеточный (30 мин, 18 000 об/мин, 4 °С, ротор J-20). Супернатант отделяли от осадка, к нему при постоянном перемешивании добавляли твердый сульфат аммония до концентрации 35% от насыщения и оставляли при 4 °С на 4-4,5 ч. Для удаления образовавшегося осадка проводили центрифугирование (30 мин, 18 000 об/мин, 4 °C, ротор J-20), отделяли супернатант, измеряли объем и затем к нему аккуратно при перемешивании добавляли твердый сульфат аммония до концентрации 85% от насыщения. Полученный раствор оставляли на ночь при 4 °С и центрифугировали в течение 30 мин (18 000 об/мин, 4 °С, ротор J-20). Супернатант удаляли, к осадку добавляли раствор сульфата аммония (35% от насыщения) в 0,1 М Na-фосфатном буфере, pH 7,0 (раствор А), аккуратно перемешивали и оставляли при 4 °C на 1,5-2 ч. Нерастворившиеся белки удаляли центрифугированием (30 мин, 16 000 об/мин, 4 °С, ротор J-20), а раствор фермента наносили на колонку 2,5 × 12 см с высо-

козамещенной фенил-сефарозой Phenyl Sepharose Fast Flow («Pharmacia Biotech», Австрия), уравновешенной раствором А. После нанесения фермента колонку промывали раствором А до исчезновения поглощения на 280 нм. Фермент элюировали с колонки нисходящим линейным градиентом сульфата аммония (35-0% от насыщения) в 0,1 М фосфатном буфере, рН 7,0, общий объем градиента 500 мл. Во время проведения хроматографии собирали фракции по 5 мл и измеряли поглощение на 280 нм (А280) и ферментативную активность (А). Отбирали фракции с постоянным отношением (активность/А₂₈₀). Обессоливание и перевод фермента в требуемый буфер проводили с помощью гельфильтрации через Sephadex G25 («Pharmacia Fine Chemicals», Швеция).

Растворимость SauFDH в растворах сульфата аммония. Для определения зависимости растворимости SauFDH от концентрации $(NH_4)_2SO_4$ к 100 мкл раствора бесклеточного экстракта (20 ед/мл) добавляли 0,6–1,8 мл насыщенного раствора сульфата аммония в 0,1 M Na- фосфатном буфере, pH 7,0, и буфер до общего объема 2 мл. Пробы оставляли на 5 ч при комнатной температуре, центрифугировали в течение 15 мин при 14 000 об/мин и 4 °C на центрифуге Ерреndorf 5415D («Ерреndorf», Германия). Затем отбирали пробы по 25 мкл и измеряли остаточную активность фермента в растворе.

Связывание SauFDH на гидрофобном носителе. Для определения оптимальной концентрации сульфата аммония для нанесения на колонку с Phenyl Sepharose Fast Flow использовали раствор фермента (раствор Б), полученный после перерастворения в растворе А (сульфат аммония 35% от насыщения в 0,1 М Na-фосфатном буфере, рН 7,0) осадка, образовавшегося после стадии осаждения в 85% от насыщения сульфате аммония. Растворы SauFDH с заданной концентрацией сульфата аммония (5-35% от насыщения) готовили добавлением к 200 мкл раствора Б необходимых объемов растворов сульфата аммония (35% от насыщения) и фосфатного буфера до общего объема 1,6 мл. К полученным пробам добавляли по 400 мкл 50%-ной суспензии Phenyl Sepharose Fast Flow в растворе сульфата аммония требуемой концентрации. Пробирки с пробами перемешивали и оставляли на столе на 15 мин для осаждения носителя. Затем отбирали пробы по 25 мкл и измеряли остаточную активность фермента в растворе.

Измерение активности. Активность SauFDH определяли спектрофотометрически по накоплению NADH на длине волны 340 нм ($\varepsilon_{340} = 6220 \text{ M}^{-1}\text{сm}^{-1}$) на спектрофотометре «Schimadzu UV 1800» при 30 °C в 0,1 М натрий-фосфатном

буфере, pH 7,0. Концентрация формиата натрия и NAD⁺ в кювете составляла 0,6 М и 1,5 мг/мл соответственно.

Анализ чистоты препаратов SauFDH. Чистоту препаратов SauFDH на разных стадиях очистки определяли с помощью аналитического электрофореза в 12%-ном полиакриламидном геле в присутствии 0,1%-ного додецилсульфата натрия на приборе Mini Protean II фирмы «Bio-Rad» (США) по протоколам фирмы производителя.

Определение концентрации SauFDH. При подготовке экспериментов по кристаллизации концентрацию исходного раствора очищенной ФДГ определяли спектрофотометрически при длине волны 280 нм на спектрофотометре «Schimadzu UV 1800» (Германия), используя коэффициент молярного поглощения, для димерной SauFDH $\varepsilon_{280} = 57180 \text{ M}^{-1}\text{сm}^{-1}$, рассчитанный по формуле, предложенной в работе [6]: $\varepsilon_{280} = 5690 \cdot N_{Trp} + 1280 \cdot N_{Tyr}$, где N_{Trp} и N_{Tyr} – количество остатков Trp и Tyr в молекуле фермента (для SauFDH шесть и девять остатков соответственно).

Для пересчета концентрации SauFDH в мг/мл молярную концентрацию фермента делили на мол. массу (М_г) димера 75 973,28 Da.

На разных стадиях очистки для определения общей концентрации белков использовали метод Бредфорда по протоколу фирмы «Bio-Rad». Однако вместо бычьего сывороточного альбумина в качестве стандарта использовали рекомбинантную FDH из бактерий *Pseudomonas* sp. 101. Разница между определением концентрации очищенной SauFDH с помощью спектрофотометрии и методом Бредфорда составляла менее 10%.

Анализ препаратов SauFDH с помощью МАLDI-масс-спектрометрии. При проведении данных исследований использовали оборудование Центра коллективного пользования «Промышленные биотехнологии» ФГУ ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН.

Для подготовки образца на анализ проводили триптический гидролиз белка в полиакриламидном геле. Из геля, окрашенного с помощью Соотassie Brilliant Blue (рис. 1), вырезали кусочек размером 3–4 мм³ с полосой фермента, который для удаления красителя дважды промывали в 100 мкл 40%-ного раствора ацетонитрила в 0,1М NH₄HCO₃ 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») в 0,05М NH₄HCO₃. Гидролиз проводили в течение 20 ч при 37 °С, затем к раствору добавляли 5,25 мкл 0,5%-ной трифторуксусной кислоты (ТФУ) в 50%-ном растворе водного ацетонитрила и тщательно перемешивали. Надгелевый раствор использовали в качестве исходного раствора для получения MALDI-массспектров.

Для масс-спектрометрического анализа на мишени смешивали по 1,5 мкл раствора образца и 0,5 мкл раствора 2,5-дигидроксибензойной кислоты (10 мг/мл, «Aldrich», США) в 20%-ном водном ацетонитриле, 0,5%-ной ТФУ («Merk», 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 ррм). Спектры получали в диапазоне масс 500–6500 m/z, выбирая мощность лазера, оптимальную для достижения наилучшего разрешения.

Идентификацию белков осуществляли с помощью программы Mascot (www.matrixscience. com). Масс-спектры были обработаны с помощью программного пакета FlexAnalysis 3.3 («Bruker Daltonics», Германия). Используя программу 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).

Кристаллизация. Первичный подбор условий кристаллизации SauFDH осуществляли методом диффузии в парах (вариант «сидячая капля») с помощью роботизированной системы кристаллизации фирмы «Rigaku» (США) [7] с использованием белкового препарата с концентрацией 10 мг/мл в буфере состава: 0,1 М Tris-HCl, pH 8,0, и стандартных наборов для кристаллизации глобулярных белков компании «Hampton Research» (США): Crystal Screen HT, Crystal Screen Cryo HT, Index HT, PEG/Ion HT, PEGRx HT и SaltRx HT. Для кристаллизации использовали кристаллизационные планшеты на 96 лунок («ArtRobbins»).

Для получения холо-формы фермента к раствору белка перед кристаллизацией добавляли NAD⁺ и конкурентный по формиату ингибитор SauFDH азид натрия до финальной концентрации 7,0 и 0,11 мМ соответственно. Оптимизацию найденных условий проводили при температуре 15 °С методом диффузии в парах (вариант «висячая капля») в 24-х луночных планшетах фирмы «VDX» (США). В каждую лунку планшета добавляли по 400 мкл осаждающего раствора. 1,5 мкл раствора белка и эквивалентное количество противораствора, смешивали и наносили на силиконизированное стекло диаметром 22 мм фирмы «Hampton Research» (США).

Сбор и обработка дифракционных данных. Перед сбором дифракционных данных кристаллы вылавливали петлёй и переносили в криораствор, содержащий, кроме компонентов, входящих в противораствор, 25%-ный глицерин, после чего кристалл в петле замораживали в парах азота. Дифракционные наборы собирали при температуре 100 К на синхротронных источниках Spring8 (станция BL41XU) и European synchrotron radiation facilities (станция ID29 [8]). Для расчета стратегии сбора данных использовали программы HKL2000 [9] и BEST [10]. Наборы были обработаны с помощью программ Mosflm [11] и XDS [12].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Получение рекомбинантной SauFDH. Получение кристаллов целевого фермента является критической стадией экспериментов по определению структуры белка с помощью метода рентгеноструктурного анализа. В свою очередь, успех кристаллизации зависит от чистоты и качества препарата фермента. Для получения высокоочищенных препаратов целевого белка часто используют аффинную металл-хелатную хроматографию путем введения последовательности из 6-12 остатков гистидина (His-tag) на N- или С-конец фермента. Однако наличие такой последовательности часто приводит к изменению свойств фермента. В случае формиатдегидрогеназ это было показано на примере ферментов из Ogataea parapolymorpha DL-1 [5, 13], Candida methylica [14], Chaetomium thermophilum [15] и Pseudomonas sp. 101 (PseFDH) [16]. Изменения в каталитических свойствах и стабильности, повидимому, связаны с влиянием His-tag на структуру фермента. Поскольку в дальнейшем структуру SauFDH планируется использовать для поиска селективных ингибиторов нативного фермента, то было решено для кристаллизации получить фермент без аффинных меток.

Культивирование штамма-продуцента рекомбинантной SauFDH. В нашей лаборатории отработана технология получения рекомбинантных

формиатдегидрогеназ как из прокариот, так и эукариот с использованием системы экспрессии на основе плазмид серии pET и штамма E. coli BL21(DE3) [2, 5]. В этой системе уровень экспрессии формиатдегидрогеназ составляет до 40% от общего растворимого белка клетки. Такое высокое содержание целевого фермента позволяет получить практически гомогенный препарат с минимальным количеством стадий очистки без введения в последовательность белка дополнительной аффинной метки. Эта система и была использована для получения SauFDH дикого типа. Как и в случае других формиатдегидрогеназ, при культивировании штамма-продуцента для SauFDH также происходит суперэкспрессия целевого белка. На рис. 1, дорожка 1 представлены данные аналитического электрофореза бесклеточного экс-тракта клеток E. coli после экспрессии в них SauFDH. Из рисунка хорошо видно, что содержание фермента составляет не менее 35-40% от растворимых белков клетки. Выход SauFDH на стадии культивирования составил ~600 мг фермента из 600 мл культуральной среды, т.е. 1 г с литра среды, что является очень высоким показателем при культивировании клеток в качалочных колбах.

Очистка рекомбинантной SauFDH. Для получения высокоочищенных препаратов формиатдегидрогеназ, экспрессированных в клетках E. coli, используется унифицированная методика, основанная на фракционировании бесклеточного экстракта сульфатом аммония с последующей гидрофобной хроматографией на Phenyl Sepharose Fast Flow [17]. Для формиатдегирогеназ с высокой термостабильностью перед фракционированием $(NH_4)_2SO_4$ проводится термообработка бесклеточного экстракта при 55 °С в течение 15-25 мин [2]. Данные дифференциальной сканирующей калориметрии показали, что SauFDH по термостабильности очень близка к таковой для PseFDH [18], которая до сих пор остается чемпионом по этому параметру среди всех описанных формиатдегидрогеназ. Поэтому в процедуру очистки SauFDH также была введена стадия термообработки бесклеточного экстракта в течение 20 мин при 55 °С. Такая обработка приводит к денатурации части белков E. coli, обеспечивает формирование крупнодисперсного осадка и упрощает последующее фракционирование сульфатом аммония

Фракционирование сульфатом аммония потребовало проведения отдельных экспериментов для нахождения оптимальных концентраций $(NH_4)_2SO_4$ как для переосаждения фермента, так и для его связывания на колонке с гидрофобным носителем. На рис. 2, *а* представ-



Рис. 1. Аналитический электрофорез в ПААГ в присутствии SDS-Na препаратов SauFDH после различных стадий очистки. 1 - суспензия клеток после ультразвуковой дезинтеграции, 2 - препарат после термообработки и фракционирования сульфатом аммония; 3-7 - различные фракции на стадии гидрофобной хроматографии, 8 - препарат SauFDH после обессоливания, M - маркер мол. массы, кДа. (С цветными вариантами рис. 1, 4 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: sciencejournals.ru/journal/biokhsm)

лена зависимость растворимости SauFDH в растворах сульфата аммония различной концентрации. На основании полученной зависимости для удаления части примесных белков и последующего осаждения фермента были выбраны концентрации $(NH_4)_2SO_4$ 35 и 85% от насыщения соответственно. На рис. 1 представлены результаты анализа препаратов SauFDH на разных стадиях очистки с помощью аналитического электрофореза в денатурирующих условиях. Данные дорожки 2 показывают, что в результате термообработки и фракционирования сульфатом аммония чистота фермента повышается до величины не менее 80%.

Финальная очистка SauFDH от примесных белков была выполнена с помощью гидрофобной хроматографии на Phenyl Sepharose Fast Flow. Было необходимо определить оптимальные концентрации сульфата аммония как для связывания фермента на носителе, так и для промывки колонки от примесных белков перед десорбцией SauFDH в нисходящем градиенте соли. На рис. 2, б представлена зависимость эффективности сорбции SauFDH на Phenyl Sepharose Fast Flow от концентрации сульфата аммония. Из рисунка видно, что полное связывание SauFDH на носителе происходит только при концентрации (NH₄)₂SO₄ 35% от насыщения. Данные рис. 2, а и б свидетельствуют, что при очистке SauFDH необходимо использовать концентрацию сульфата аммония 35% от насыщения. Эти результаты отличаются от данных по другим формиатдегидрогеназам. Например,



Рис. 2. Влияние концентрации сульфата аммония на растворимость SauFDH (*a*) и связывание фермента на Phenyl Sepharose Fast Flow (δ); 0,1 М фосфатный буфер, pH 7,0, 25 °C

в случае PseFDH на стадии фракционирования используются концентрации сульфата аммония 40 и 80% от насыщения, а при нанесении фермента на колонку с гидрофобным носителем и последующей промывки носителя оптимальной будет концентрация $(NH_4)_2SO_4$ 30% от насыщения [17]. Такая разница в поведении ферментов в присутствии сульфата аммония, по-видимому, связана с существенным различием аминокислотных последовательностей этих формиатдегидрогеназ (гомология менее 40% [5]).

На рисунке 3 представлены результаты очистки SauFDH с помощью гидрофобной хроматографии. Для экспресс-анализа чистоты препаратов фермента в отдельных фракциях использовали величину отношения активность/поглощение на 280 нм. Как следует из рис. 3, для фракций 7—13 эта величина практически постоянная, что свидетельствует об одинаковой чистоте препаратов SauFDH в этих фракциях. Результаты анализа препаратов фермента в различных фракциях (рис. 1, дорожки 3-7) с помощью аналитического электрофореза в денатурирующих условиях свидетельствуют, что после стадии гидрофобной хроматографии получается практически гомогенная SauFDH. Всего было получено 400 мг высокоочищенного фермента с выходом по активности 61%.

Расчет величины удельной активности для полученной SauFDH дал неожиданный результат. Она оказалась равной 20 ед/мг белка. Для всех ранее описанных формиатдегидрогеназ наибольшей активностью обладали ферменты из бактерий – 10 ед/мг белка. Максимальная удельная активность для известных ФДГ из дрожжей и растений составляет 6,5 ед/мг белка [2, 3, 5, 19, 20]. Инженерия каталитических свойств формиатдегидрогеназ методом рационального дизайна в случае бактерий позволила улучшить значения К_М по формиату и коферменту NAD⁺, но не каталитическую константу [20, 21]. В случае ФДГ из дрожжей Candida boidinii методом направленной эволюции, а для ФДГ из сои методом рационального дизайна, удельная активность ферментов была повышена в 1,7 раза [22, 23]. Таким образом, по своей активности SauFDH минимум в два раза превосходит все другие известные ФДГ. Формиатдегидрогеназы активно используются для регене-



Рис. 3. Очистка формиатдегидрогеназы *S. aureus* гидрофобной хроматографией на Phenyl Sepharose Fast Flow в нисходящем градиенте концентрации сульфата аммония (35–0% от насыщения). 1 – Активность SauFDH в отдельной фракции, ед/мл; 2 – поглощение фермента на 280 нм A_{280} ; 3 – относительная активность ед/ A_{280} . Стрелками указаны оси, соответствующие данной кривой. 0,1 M Na-фосфатный буфер, pH 7,0



Рис. 4. Кристаллы апо- (a) и холо-форм (б) SauFDH, выросшие в оптимизированных условиях

рации NAD(P)H в процессах хирального синтеза с помощью оксидоредуктаз [2, 5]. Поэтому SauFDH является очень перспективным кандидатом для применения на практике. Кроме того, определение структуры этого фермента позволит исследовать причины такой высокой каталитической активности.

Анализ препарата SauFDH с помощью тандемной MALDI масс-спектрометрии показал идентичность аминокислотной последовательности белка, кодируемой геном *saufdh2* в плазмиде pET23a, т.е при экспрессии и очистке фермент не претерпевает посттрансляционной модификации.

Получение гомогенных препаратов SauFDH в препаративных количествах позволило перейти к экспериментам по кристаллизации. SauFDH является высокостабильным ферментом [18]. Он не терял активности при хранении при 4 °C в течение 12 месяцев. Поэтому одной партии полученного препарата SauFDH было достаточно для проведения всего цикла экспериментов по кристаллизации.

Кристаллизация. Скрининг условий кристаллизации свободной формы SauFDH и комплекса с кофактором проводился в кристаллизационных планшетах на 96 лунок (ArtRobbins), при этом каждая лунка содержала три подлунки, которые использовались для варьирования концентрации белка в рамках одного условия кристаллизации. Таким образом, один кристаллизационный планшет позволял провести скрининг $96 \times 3 = 288$ кристаллизационных условий. Всего было подготовлено 6 таких планшетов при двух значениях температуры 15 и 4 °С (итого 1728 вариантов). Соотношения белка и противораствора в каждой лунке были следующими: 1:1, 2:1 и 1:2, при этом суммарный объем белка в лунке был 0,1 мкл для соотношений 1:1 и 2:1 или 0,2 мкл для соотношения 1:2 соответственно. Объем противораствора составлял 50 мкл.

Первые кристаллы для апо-формы белка были получены в следующих условиях: 0,1М НЕРЕЅ, pH 7,5, 2% -ный PEG 400, 2 М сульфат аммония. Кристаллы росли при температуре 15 °С в течение 7 дней, имели ромбическую форму и достигали размеров порядка 30 мкм по наибольшей из граней. К сожалению, полученные на данном этапе кристаллы имели слишком малые размеры. Поэтому найденные условия кристаллизации нуждались в дальнейшей оптимизации.

Для получения кристаллов холо-формы фермента к раствору белка перед кристаллизацией добавляли NAD⁺ и азид натрия. Раствор затем центрифугировали для удаления примесей и возможных агрегатов, и проводился первичный скрининг по методике, описанной выше. В результате первичного скрининга для холо-формы SauFDH были найдены следующие условия. Вариант 1 – 0,2 M CaCl₂, 0,1 M ацетат натрия pH 4,6, 30%-ный 2-метипентадиол-2,4 и вариант 2 – 0,1 M HEPES-Na, pH 7,5, 1,4 M трехзамещенный цитрат натрия. В обоих условиях были обнаружены микрокристаллические осадки,

ПОМЕТУН и др.

Параметр	Апо-форма	Холо-форма*
Пространственная группа	P4 ₃ 2 ₁ 2	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
a, b, c, Å	116,91; 116,91; 186,77	69,73; 87,09; 117,57
$\alpha = \beta = \gamma$, град	90,0	90,0
Т, К	100	100
λ, Å	1,0	0,96770
Разрешение, Å	99,1-2,2 (2,26-2,20)*	87,1-2,7 (2,87-2,72)
Число независимых рефлексов	66 243 (14959)	19 763 (2838)
Повторяемость	9,6 (7,5)	4,3 (4,1)
Полнота набора, %	99,9 (99,9)	99,5 (99,7)
Ι/σ (Ι)	20,15 (3,3)	6,5 (2,5)
R _{meas} , %	8,9 (59,5)	24,7 (80,7)
CC _{1/2}	99,9 (88,1)	96,8 (45,2)

Кристаллографические данные и параметры съемки кристаллов апо- и холо-форм NAD⁺-зависимой формиатдегидрогеназы из *S. maureus*

* Кристаллизация в присутствии 7,0 мМ NAD⁺ и 0,11 мМ азида натрия.

** Данные в скобках приведены для последнего слоя.

которые ввиду малого размера (~10 мкм) и плохой морфологии нельзя было использовать для рентгеноструктурного исследования.

Поскольку для обеих форм фермента были получены кристаллы, непригодные для РСА, то был проведен дополнительный этап оптимизация найденных условий, заключавшийся в варьировании параметров кристаллизации в узких пределах относительно таковых, найденных на первом этапе. Кристаллы апо-формы, пригодные для рентгеноструктурного эксперимента, были получены в следующих условиях – 0,1 М HEPES, pH 7,0, 2%-ный PEG 400, 0,1 М хлорид натрия и 1,9 М сульфат аммония (рис. 4, *a*). Для холо-формы SauFDH кристаллы были получены в течение 30 дней при 15 °C (0,1М HEPES, pH 7,5, 1,4 М трехосновный цитрат натрия и 10% трегалоза) (рис. 4, б). Из рис. 4, а и б видно, что визуально качество кристаллов для апоформы выше, чем для холо-SauFDH. Для удобства на рис. 4 кристаллы для апо- и холо-форм представлены в сравнимом виде, однако их реальные размеры составляют 200 и 40 мкм соответственно. Тем не менее, качество кристаллов было достаточно для их исследования с помощью рентгеноструктурного анализа.

Сбор и обработка дифракционных данных. Дифракционные наборы собирали при температуре 100 К на синхротронных источниках Spring8 (станция BL41XU) и European synchrotron radiation facilities (станция ID29). Статистика наборов данных приведена в таблице.

Полученные кристаллы апо- и холо-форм SauFDH дифрагировали до разрешения 2,2 и 2,7 Å соответственно, и принадлежали к разным пространственным группам (таблица), что может свидетельствовать о связывании кофактора в случае холо-формы. Оценка содержания растворителя в элементарной ячейке по методу Мэттьюса [24], проведенная с помощью пакета ССР4і [25], показала, что в независимой части как апо-, так и холо-формы находятся по две субъединицы белка, что типично для данного класса ферментов, функционирующих в виде стабильных гомодимеров.

Таким образом, в результате выполненных экспериментов получена новая рекомбинантная формиатдегидрогеназы из патогена *S. aureus*, которая имеет самую высокую удельную активность среди всех ранее описанные в литературе аналогичных ферментов. Также получены кристаллы и собраны дифракционные данные, необходимые для определения структур апо- и холоформ SauFDH, которые будут использованы в последующих исследованиях по поиску высокоэффективных ингибиторов фермента.

Финансирование. Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ (соглашения 17-04-01662 и 20-04-00915 – получение и кристаллизации фермента), Федерального космического агентства (эксперимент «Кристаллизатор» – кристаллизация и сбор данных рентгеноструктурного эксперимента) и Министерства науки и высшего образования РФ (предварительный анализ данных РСА).

Благодарности. При проведении исследований было использовано оборудование Центра коллективного пользования «Промышленные

814

биотехнологии» ФГУ ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Tishkov, V. I., and Popov, V. O. (2004) Catalytic mechanism and application of formate dehydrogenase, *Biochemistry* (*Moscow*), 69, 1252-1267, doi: 10.1007/s10541-005-0071-x.
- Tishkov, V. I., and Popov, V. O. (2006) Protein engineering of formate dehydrogenase, *Biomol. Eng.*, 23, 89-110, doi: 10.1016/j.bioeng.2006.02.003.
- 3. Alekseeva, A. A., Savin, S. S., and Tishkov, V. I. (2011) NAD⁺-dependent formate dehydrogenase from plants, *Acta Naturae*, **3**, 38-54, PMID: 22649703.
- 4. Resch, A., Rosenstein, R., Nerz, C., and Gotz, F. (2005) Differential gene expression profiling of *Staphylococcus aureus* cultivated under biofilm and planktonic conditions, *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 2663-2676.
- 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.
- Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G., and Gray, T. (1995) How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein, *Protein Sci.*, 4, 2411-2423, doi: 10.1002/pro.5560041120.
- Boyko, K. M., Lipkin, A. V., Popov, V. O., and Kovalchuk, M. V. (2013) From gene to structure: the protein factory of the NBICS centre of Kurchatov institute, *Crystallogr. Rep.*, 58, 442-449, doi: 10.1134/S106377451105004x.
- De Sanctis, D., Beteva, A., Caserotto, H., Dobias, F., Gabadinho, J., Giraud, T., Gobbo, A., Guijarro, M., Lentini, M., Lavault, B., Mairs, T., McSweeney, S., Petitdemange, S., Rey-Bakaikoa, V., Surr, J., Theveneau, P., Leonard, G. A., and Mueller-Dieckmann, C. (2012) ID29: a high-intensity highly automated ESRF beamline for macromolecular crystallography experiments exploiting anomalous scattering, J. Synchrotron Radiat., 19, 455-461, doi: 10.1107/S0909049512009715.
- 9. Otwinowski, Z., and Minor, W. (1997) Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode, *Methods Enzymol.*, **276**, 307-326.
- Bourenkov, G. P., and Popov, A. N. (2006) A quantitative approach to data-collection strategies, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 62, 58-64, doi: 10.1107/S0907444905033998.
- Battye, T. G. G., Kontogiannis, L., Johnson, O., Powell, H. R., and Leslie, A. G. W. (2011) iMOSFLM: a new graphical interface for diffraction-image processing with MOSFLM, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 67, 271-281, doi: 10.1107/S0907444910048675.
- 12. Kabsch, W. (2010) XDS, Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr., 66, 125-132, doi: 10.1107/S0907444909047337.
- Yu, S., Zhu, L., Zhou, C., An, T., Zhang, T., Jiang, B., and Mu, W. (2014) Promising properties of a formate dehydrogenase from a methanol-assimilating yeast *Ogataea parapolymorpha* DL-1 in His-tagged form, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 98, 1621-1630, doi: 10.1007/s00253-013-4996-5.
- Ordu, E. B., and Karagüler, N. G. (2007) Improving the purification of NAD⁺-dependent formate dehydrogenase from *Candida methylica*, *Prepar. Biochem. Biotechnol.*, 37, 333-341, doi: 10.1080/10826060701593233.

- 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), *Prepar. Biochem. Biotechnol.*, **49**, 529-534, doi: 10.1080/10826068.2019.1599394.
- Пометун А. А., Паршин П. Д., Галаничева Н. П., Упоров И. В., Атрошенко Д. Л., Савин С. С., Тишков В. И. (2020) Влияние последовательности His₆ на свойства формиатдегидрогеназы из бактерий *Pseudomonas* sp. 101, *Вестник МГУ, Сер. 2 Химия*, **61**, 317-325.
- Rojkova, A. M., Galkin, A. G., Kulakova, L. B., Serov, A. E., Savitsky, P. A., Fedorchuk, V. V., and Tishkov, V. I. (1999) Bacterial formate dehydrogenase. Increasing the enzyme thermal stability by hydrophobization of alpha helices, *FEBS Lett.*, 445, 183-188, doi: 10.1016/S0014-5793(99)00127-1.
- Pometun, A. A., Kleymenov, S. Yu, Zarubina, S. A., Kargov, I. S., Parshin, P. D., Sadykhov, E. G., Savin, S. S., and Tishkov, V. I. (2018) Comparison of thermal stability of new formate dehydrogenases with differential scanning calorimetry, *Moscow Univ. Chem. Bull.*, **73**, 80-84, doi: 10.3103/S002713141802013X.
- Slusarczyk, H., Felber, S., Kula, M. R., and Pohl, M. (2000) Stabilization of NAD-dependent formate dehydrogenase from *Candida boidinii* by site-directed mutagenesis of cysteine residues, *Eur. J. Biochem.*, 267, 1280-1289, doi: 10.1046/j.1432-1327.2000.01123.x.
- Tishkov, V. I., Goncharenko, K. V., Alekseeva, A. A., Kleymenov, S. Yu., and Savin, S. S. (2015) Role of a structurally equivalent phenylalanine residue in catalysis and thermal stability of formate dehydrogenases from different sources, *Biochemistry* (*Moscow*), **80**, 1690-1700, doi: 10.1134/S0006297915130052.
- Alekseeva, A. A., Fedorchuk, V. V., Zarubina, S. A., Sadykhov, E. G., Matorin, A. D., Savin, S. S., and Tishkov, V. I. (2015) Role of Ala198 in stability and coenzyme specificity of bacterial formate dehydrogenases, *Acta Naturae*, 7, 60-69, PMID: 25927002.
- Slusarczyk, H., Felber, S., Kula, M.-R., and Pohl, M. (2003) Novel mutants of formate dehydrogenase from *Candida boidinii*, US Patent Application Publication US2003/0157664, 21.09.2003.
- Kargov, I. S., Kleymenov, S. Y., Savin, S. S., Tishkov, V. I., and Alekseeva, A. A. (2015) Improvement of the soy formate dehydrogenase properties by rational design, *Prot. Eng. Des. Select.*, 28, 171-178, doi: 10.1093/protein/ gzv007.
- Matthews, B. W. (1968) Solvent content of protein crystals, J. Mol. Biol., 33, 491-497, doi 10.1016/0022-2836(68)90205-2.
- Winn, M. D., Ballard, C. C., Cowtan, K. D., Dodson, E. J., Emsley, P., Evans, P. R., Keegan, R. M., Krissinel, E. B., Leslie, A. G., McCoy, A., McNicholas, S. J., Murshudov, G. N., Pannu, N. S., Potterton, E. A., Powell, H. R., Read, R. J., Vagin, A., and Wilson, K. S. (2011) Overview of the CCP4 suite and current developments, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 67, 235-242, doi: 10.1107/ S0907444910045749.

HIGHLY ACTIVE RECOMBINANT FORMATE DEHYDROGENASE FROM PATHOGENIC BACTERIUM Staphylococcus aureus: PREPARATION AND CRYSTALLIZATION*

A. A. Pometun^{1,2,3#}, K. M. Boyko^{2#}, T. S. Yurchenko^{1,2}, A. Yu. Nikolaeva^{2,4}, I. S. Kargov^{2,3}, D. L. Atroshenko^{1,2,3}, S. S. Savin^{1,2,3}, V. O. Popov^{2,4}, and V. I. Tishkov^{1,2,3**}

¹ Lomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry, 119991 Moscow, Russia; E-mail: vitishkov@gmail.com
² Bach Institute of Biochemistry, Research Centre "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences, 119071 Moscow, Russia
³ Innovations and High Technologies MSU Ltd. 109559 Moscow, Russia

⁴ National Research Center "Kurchatov institute", 123182 Moscow, Russia

Received April 16, 2020 Revised May 2, 2020 Accepted May 2, 2020

NAD⁺-dependent formate dehydrogenase from *Staphylococcus aureus* (SauFDH) is one of the key enzymes responsible for the survival of this pathogen in the form of biofilms. 3D structure of the enzyme might be helpful in the search for highly specific SauFDH inhibitors that can be used as antibacterial agents exactly against *S. aureus* biofilms. Here, we prepared a recombinant SauFDH in *Escherichia coli* cells with a yield of 1 g target protein per liter medium. The developed procedure for the enzyme purification allowed to obtain 400 mg of homogenous enzyme with 61% yield. The specific activity of the purified recombinant SauFDH was 20 U per mg protein, which was 2 times higher than the previously reported activities of formate dehydrogenases. We also found crystallization conditions in the course of two rounds of optimization and obtained 200- and 40-µm crystals for the SauFDH apo- and holoenzymes, respectively. X-ray analysis using synchrotron X-ray sources produced diffraction data sufficient for solving the three-dimensional structures of the apo- and holoenzymes with the resolution of 2.2 and 2.7 Å, respectively. Crystals of the apo- and holoforms of SauFDH had different crystal space groups, which suggest coenzyme binding in the SauFDH holoenzyme.

Keywords: formate dehydrogenase, Staphylococcus aureus, expression, purification, crystallization, X-ray diffraction analysis