

**NAD⁺-ЗАВИСИМАЯ ФОРМИАТДЕГИДРОГЕНАЗА
ИЗ ТЕРМОТОЛЕРАНТНЫХ ДРОЖЖЕЙ *Ogataea parapolymorpha*:
СВОЙСТВА И БЕЛКОВАЯ ИНЖЕНЕРИЯ
N-КОНЦЕВОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ**

© 2023 А.А. Пометун^{1,2*}, Л.А. Шапошников^{1,2}, С.А. Зубанова²,
Р.П. Ковалевский², Д.Л. Агрошенко^{1,2}, Е.В. Пометун³, С.С. Савин^{1,2}, В.И. Тишков^{1,2*}

¹ Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН,
Институт биохимии им. А.Н. Баха, 119071 Москва, Россия;
электронная почта: aapometun@gmail.com, vitishkov@gmail.com

² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет,
119991 Москва, Россия

³ ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет),
119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 12.06.2023

После доработки 07.07.2023

Принята к публикации 12.07.2023

Ранее в нашей лаборатории был клонирован ген формиатдегидрогеназы (ФДГ, КФ 1.2.1.2) из термотолерантных метилотрофных дрожжей *Ogataea parapolymorpha* DL-1 (ОраFDH). Рекомбинантный фермент с дополнительным аминокислотным остатком глицина (ОраFDH_GK) был получен в клетках *Escherichia coli* в активной и растворимой форме с выходом более 1 г с одного литра среды. В настоящей работе проведено подробное сравнение этого фермента с ФДГ из других источников. Среди формиатдегидрогеназ из эукариот ОраFDH имеет самую высокую термостабильность. Для выяснения влияния N-концевого остатка на свойства фермента также были получены варианты ОраFDH_K (идентичный природному) и ОраFDH_AK, содержащий на N-конце дополнительный остаток аланина. Показано, что добавление к N-концу остатка Ala уменьшает в 4 раза константу скорости термоинактивации по сравнению с добавлением остатка Gly. Добавление еще 6 остатков гистидина на N-конец ОраFDH_AK приводит к ускорению очистки, практически не влияет на кинетические параметры, но несколько снижает температурную стабильность, которая, однако, может быть восстановлена до уровня ОраFDH_AK добавлением 0,5 М NaCl.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: формиатдегидрогеназа, *Ogataea parapolymorpha* DL-1, термотолерантные дрожжи, экспрессия в *E. coli*, каталитические свойства, очистка, температурная стабильность, сайт-направленный мутагенез.

DOI: 10.31857/S0320972523090178, EDN: WVQLMP

ВВЕДЕНИЕ

Формиатдегидрогеназа (ФДГ, КФ 1.2.1.2.) катализирует реакцию восстановления кофермента NAD(P)⁺ до NAD(P)H. ФДГ найдена как в прокариотических, так и в эукариотических организмах (растениях, дрожжах и микроскопических грибах), где играет важную физиологическую роль в обеспечении клетки энергией [1–4]. Формиатдегидрогеназа является

высокоэффективным биокатализатором для регенерации кофермента NADH или NADPH в процессах синтеза оптически активных соединений [1]. Преимуществами ФДГ являются: 1) практически полная необратимость катализируемой реакции, 2) продукт реакции CO₂ не загрязняет целевой продукт, 3) невысокая стоимость субстрата – формиат-иона и 4) широкий pH-оптимум активности и стабильности фермента. Примером практического процесса

Принятые сокращения: ФДГ – формиатдегидрогеназа; СboFDH – формиатдегидрогеназа из дрожжей *Candida boidinii*; ОраFDH – формиатдегидрогеназа из дрожжей *Ogataea parapolymorpha* DL-1; PseFDH – формиатдегидрогеназа из бактерий *Pseudomonas* sp. 101.

* Адресат для корреспонденции.

хирального синтеза является разработанный и реализованный компанией «Evonik» (ранее «Degussa») еще в середине 90-х гг. прошлого века процесс получения L-трет-лейцина – прекурсора при получении пептидов, которые используются в качестве ингибиторов протеазы ВИЧ и антираковых агентов [5]. Регенерация восстановленного NADH в этом процессе осуществляется с помощью ФДГ из дрожжей *Candida boidinii* (CboFDH). Вплоть до настоящего времени данный процесс является самым крупномасштабным процессом хирального синтеза с использованием индивидуальных ферментов [1]. Эффективность процесса могла бы быть значительно выше при использовании более стабильной ФДГ. Поэтому создание фермента с оптимальными свойствами для промышленного использования является важной биотехнологической задачей. На настоящий момент проведено клонирование множества генов формиатдегидрогеназы. Одним из наиболее изученных ферментов является ФДГ из метилотрофных бактерий *Pseudomonas* sp. 101 (PseFDH), ген которой был клонирован в 1993 г. [6]. PseFDH до сих пор является наиболее термостабильным ферментом среди всех исследованных формиатдегидрогеназ.

Термотолерантные организмы представляют особый интерес для промышленного производства, поскольку продуцируют, как правило, термостабильные ферменты. Большое внимание уделяется метилотрофным дрожжам *Ogataea parapolyomorpha* DL-1 (прежнее название *Hansenula polymorpha*), которые широко используются для получения различных рекомбинантных белков. Геном этих дрожжей был секвенирован в 2012 г. (идентификатор в базе данных GenBank: GCA_000187245.3). В 2014 г. китайскими исследователями был получен синтетический ген ФДГ из *O. parapolyomorpha* DL-1 [7]. Ключевой особенностью генно-инженерной конструкции для получения рекомбинантного фермента было добавление на C-конец 6 остатков гистидина (далее OpaFDH_HisC), однако авторы не учли тот факт, что C-конец фермента участвует в формировании кофермент-связывающего домена активного центра, и это существенно повлияло на кинетические параметры. $K_M^{\text{NAD}^+}$ OpaFDH с His-tag на C-конце составлял 83 мкМ, а каталитическая константа $k_{\text{cat}} - 2,7 \text{ с}^{-1}$ [7]. Нами ген ФДГ из *O. parapolyomorpha* DL-1 (OpaFDH) был клонирован с использованием хромосомной ДНК без введения дополнительной последовательности His-tag [8]. $K_M^{\text{NAD}^+}$ и каталитическая константа k_{cat} для этого фермента составили 14 мкМ и $4,5 \text{ с}^{-1}$ соответственно [8].

При клонировании гена *opafdh* в его нуклеотидную последовательность после стартового триплета остатка Met нами был добавлен кодон остатка Gly. Полученная конструкция получила обозначение OpaFDH_GK [8]. Термостабильность фермента была исследована с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии и было показано, что OpaFDH_GK является ферментом, обладающим самой высокой термостабильностью среди ФДГ эукариот [9]. Кроме того, по своей температурной стабильности OpaFDH совсем немного уступает наиболее стабильным ФДГ из бактерий. Для OpaFDH_GK была проведена успешная кристаллизация [10].

В настоящей работе описана функциональная характеристика рекомбинантной OpaFDH_GK и проведено подробное сравнение с другими ФДГ. Проведен анализ N-концевой аминокислотной последовательности, получены несколько мутантных форм с измененной структурой N-конца. Для этих ферментов проведена экспрессия, очистка, определение их свойств. Выбрана наиболее интересная мутантная форма с модификациями N-конца, и на ее основе сделан фермент, содержащий последовательность из 6 остатков гистидина и изучены его основные свойства.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. Для генно-инженерных экспериментов использовали реактивы марки «Molecular Biology Grade». В микробиологических экспериментах применяли бактотриптон, дрожжевой экстракт и агар («Difco», США); глицерин (99,9%) и хлорид кальция («ultrapure»), гидрофосфат калия, дигидрофосфат натрия («pure for analysis»), лизоцим («Fluka/BioChemika», Швейцария); лактозу «analytical grade», канамицин и хлорамфеникол («Sigma», США); хлорид натрия («pure for analysis»; «Хеликон», Россия). Эндонуклеазы рестрикции, ДНК-лигазу фага T4 и *Pfu*-ДНК-полимеразу фирмы «Thermo» (США) использовали для направленного мутагенеза и клонирования фрагментов ДНК. Для очистки ДНК из агарозного геля и выделения плазмид из клеток *Escherichia coli* использовали наборы реагентов фирмы «Thermo». Олигонуклеотиды для проведения полимеразной цепной реакции были синтезированы фирмой «Синтол» (Россия); секвенирование нуклеотидных последовательностей проводили в ЦКП Геном института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН.

Таблица 1. Последовательности праймеров, использованных в работе

Название праймеров	Последовательность праймеров (5'→3')
ОраFOR_GK	C ATC AAT CAC <u>CAT ATG</u> GGC AAG GTT GTA CTA GTT CTC
ОраREV	CAG CTC CTT <u>AAG CTT</u> TTA TTA TTT GTC GGC ACC GTA C
ОраFOR_K	GAA GGA GAT ATA <u>CAT ATG</u> AAG GTT GTA CTA GTT C
ОраFOR_AK	C ATC AAT CAC <u>CAT ATG</u> GCG AAG GTT GTA CTA GTT CTC
ОраFOR_AK	C ATC AAT CAC <u>CAT ATG</u> GCG AAG GTT GTA CTA GTT CTC
ОраFOR_HIS_AK	GAA GGA GAT ATA <u>CAT ATG</u> CAC CAC CAC CAC CAC GCC AAG GTT GTA CTA GTT C

Примечание. Подчеркиванием выделены сайты рестрикции – *NdeI* (CATATG; ОраFOR) и *HindIII* (AAGCTT; ОраREV).

Все реактивы, использованные для электрофореза белков, произведены фирмой «BioRad» (США). Для очистки и изучения свойств фермента применяли сульфат аммония и имидазол марки «х.ч.» («ДиаМ», Россия), мочевины марки «ч.д.а.» («РеаХим», Россия), NAD^+ с чистотой не менее 99% фирмы «AppliChem» (Германия), ЭДТА «pure for analysis» и родонит аммония фирмы «Merck» (Германия), формиат натрия и дигидрофосфат натрия «ч.д.а.» («РеаХим», Россия), азид натрия («Serva», Германия) и нитрит калия («PanReas», Испания).

Методы исследования. Получение генетических конструкций. Ген формиатдегидрогеназы *O. parapolymorpha* (ОраFDH) клонировали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). В качестве матрицы использовали хромосомную ДНК *O. parapolymorpha*, которая была любезно предоставлена профессором О.А. Донцовой (НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ). Для получения генетических конструкций были синтезированы праймеры на начало и конец гена (ОраREV и ОраFOR_GK). Вначале проводили клонирование гена с дополнительным триплетом, кодирующим остаток глицина. Далее, с использованием праймеров ОраFOR_K, ОраFOR_AK и ОраFOR_HIS_AK и праймера ОраREV были получены конструкции, кодирующие ОраFDH, аналогичную природной и с модификациями N-концевой последовательности. Последовательности праймеров, использованных в работе приведены в табл. 1.

Реакционная смесь для проведения ПЦР содержала 2,5 мкл 10-кратного буфера для *Pfu*-ДНК-полимеразы с магнием, поставляемого фирмой-производителем вместе с ферментом; 2,5 мкл смеси dNTP (2,5 мМ каждого); 1 мкл ДНК-матрицы (≈ 10 нг/мкл); по 2 мкл праймеров (10 нмоль/мл); 0,5 мкл *Pfu*-ДНК-полиме-

разы (2,5 Ед./мкл) и деионизованную воду до общего объема смеси 25 мкл. Пробирку прогревали в течение 5 мин при 95 °С, и затем проводили ПЦР по следующей программе: 95 °С – 30 с, 62 °С – 60 с, 72 °С – 2 мин, всего 25–35 циклов. После этого реакцию смесь выдерживали еще 10 мин при 72 °С. В качестве матрицы для получения генов, кодирующих другие последовательности N-конца фермента, была использована плазмидная ДНК, содержащая ген *opafdh_GK*. ПЦР проводили аналогично.

Полученные ПЦР-продукты обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *NdeI/HindIII* и очищали электрофоретически в 1%-ном агарозном геле. Рестриктонные фрагменты лигировали с использованием ДНК-лигазы фага T4 с обработанным теми же эндонуклеазами рестрикции вектором pET24a+ («Novagen», США). Реакционной смесью после лигирования трансформировали клетки *E. coli* DH5 α и высевали их на чашки Петри с агаризованной средой, содержащей канамицин (30 мкг/мл), и выдерживали 12 ч при 37 °С. Для каждого клон ОраFDH с чашки брали по 2 колонии и из них выделяли плазмиды. Для контроля последовательности получаемого ДНК-материала проводили секвенирование плазмидных ДНК. Полученные нуклеотидные последовательности анализировали с помощью программы ClustlX 1.83.

Экспрессия формиатдегидрогеназ в клетках *E. coli*. Экспрессию генов целевых ФДГ проводили в клетках *E. coli* BL21(DE3) CodonPlus/pLysS по стандартной методике, разработанной в нашей лаборатории с использованием музейных культур. Для получения музейной культуры штамм *E. coli* BL21(DE3) CodonPlus/pLysS трансформировали плазмидной ДНК с подтвержденной последовательностью целевого гена.

Полученную после трансформации смесь высевали на чашки с агаризованной средой 2YT, содержащей антибиотика канамицин и хлорамфеникол, чашки инкубировали в течение ночи при 30 °С. Затем с чашки Петри брали единичную колонию и помещали в 2 мл среды 2YT, содержащей антибиотика хлорамфеникол (25 мкг/мл) и канамицин (30 мкг/мл). Клетки культивировали при 37 °С до достижения поглощения среды при 600 нм (A_{600}) величины 0,7–0,8. Из пробирки стерильно отбирали 150 мкл суспензии и помещали в стерильные контейнеры для хранения музейных культур с 50 мкл стерильного 50% (v/v) раствора глицерина. Полученную музейную культуру хранили при –85 °С и использовали по мере надобности. Собственно процесс экспрессии включал несколько стадий. 1) 10 мкл музейной культуры культивировали в 4 мл среды с антибиотиками хлорамфеникол (25 мкг/мл) и канамицин (30 мкг/мл) в течение ночи при 37 °С и 180 об./мин в течение 12–14 ч. 2) 20 мкл ночной культуры пересевали в 100 мл колбы с отбойниками, содержащими 20 мл среды 2YT с вышеуказанными антибиотиками, и культивировали на качалке при 37 °С и 120 об./мин. 3) По достижении культуральной средой значений поглощения при 600 нм 0,6–0,8 полученный раствор из колбы на 100 мл переносили в качалочную колбу с отбойниками объемом 1 литр, с 200 мл среды 2YT с 1% (v/v) глицерином и культивировали при 30 °С и 120 об./мин. После достижения значения поглощения $A_{600} = 0,6–0,8$ проводили индукцию клеток, добавляя 0,1 М раствор изопропилтиогалактозида (IPTG) до конечной концентрации индуктора 0,1 мМ. Через 2 ч после индукции в колбы добавляли раствор формиата натрия (200 г/литр) до конечной концентрации 1 г/литр и продолжали культивирование еще 12–14 ч (20 °С, 120 об./мин). 4) Через 14 ч клетки осаждали на центрифуге Eppendorf 5804R («Eppendorf», Германия) в течение 30 мин при 6000 об./мин и 4 °С. Полученный осадок ресуспендировали (концентрация клеток – 20% по массе) в 0,1 М Na-фосфатном буфере, pH 8,0 (для очистки ферментов ОраFDH_K, ОраFDH_GK, ОраFDH_AK) и в 50 мМ Tris-HCl-буфере, содержащем 0,5 М NaCl, 20 мМ имидазол, pH 7,5 (для фермента, содержащего гистидиновою метку), и подвергали заморозке при –20 °С.

Выделение и очистка. Очистка ферментов без His-tag. Для очистки ферментов без His-tag использовали методику, разработанную для получения рекомбинантной PseFDH дикого типа [11]. Полученную на предыдущем этапе

суспензию подвергали двум циклам заморозки-разморозки, и затем клетки разрушали с использованием ультразвукового дезинтегратора («Branson Sonifier 250», Германия) при постоянном охлаждении. Осадок удаляли центрифугированием на центрифуге Eppendorf 5804 R (11 000 об./мин, 30 мин), а к супернатанту добавляли по каплям насыщенный раствор сульфата аммония до концентрации, равной 30% от насыщения. Полученный раствор инкубировали несколько часов при 4 °С. Осадок отделяли с помощью центрифугирования на центрифуге Beckman J21 («Beckman Coulter», США) при 20 000 об./мин (30 мин, 4 °С), супернатант использовали для гидрофобной хроматографии на Phenyl Sepharose Fast Flow («Pharmacia Biotech», Швеция) в нисходящем градиенте (30–0%) концентрации сульфата аммония в 0,1 М натрий-фосфатном буфере (pH 7,0). Собирали активные фракции, содержащие искомым фермент в растворе сульфата аммония. Далее, препарат фермента обессоливали на колонке с Sephadex G25 («Pharmacia Fine Chemicals», Швеция) в том же буферном растворе. Контроль чистоты полученных препаратов осуществлялся с помощью аналитического электрофореза в 12%-ном полиакриламидном геле в присутствии 0,1% додецилсульфата натрия на приборе для электрофореза MiniProtean II («Bio-Rad», США).

Очистка фермента, содержащего гистидиновою метку. Клетки разрушали ультразвуком как описано выше. Полученный раствор фермента после экспрессии (50 мМ Tris-HCl, 0,5 М NaCl, 20 мМ имидазол, pH 7,5) наносили на колонку объемом 1 мл HisTrap FF Ni Sepharose 6 Fast Flow («Cytiva», США), уравновешенную раствором, содержащим 50 мМ Tris-HCl, 0,5 М NaCl, 20 мМ имидазол, pH 7,5 (раствор А). После нанесения фермента колонку промывали раствором А в течение 30 мин до исчезновения поглощения при 280 нм. Фермент элюировали с колонки восходящим линейным градиентом раствора Б, содержащего 50 мМ Tris-HCl, 0,5 М NaCl, 0,5 М имидазол, pH 7,5. Начальная точка градиента – 0% раствора Б, конечная точка градиента – 60% раствора Б. Объем градиента – 10 мл. Во время проведения хроматографии собирали фракции по 2 мл и измеряли поглощение при 280 нм (A_{280}) и ферментативную активность (A_{340}). Фракции с максимальным соотношением (A_{340}/A_{280}) объемом ~2 мл для обессоливания наносили на колонку 1 × 10 см (объем – 10 мл) с Sephadex G25. Для обессоливания использовали раствор, содержащий 50 мМ Tris-HCl (pH 7,5).

имеется остаток Ala, однако, как следует из рис. 1, структура *N*-конца бактериальных ферментов кардинально отличается от таковой у ФДГ из дрожжей и растений. Согласно «правилу Варшавского», наличие на *N*-конце белка остатка Lys может неблагоприятно сказываться на стабильности фермента при его экспрессии [13]. Например, ФДГ из дрожжей *C. boidinii* при экспрессии в клетках *E. coli* расщепляется протеазами клетки намного быстрее, чем фермент из бактерий *Pseudomonas* sp. 101 [14]. В связи с вышесказанным для повышения стабильности рекомбинантной ОраFDH при ее экспрессии в клетках *E. coli* было решено в ген фермента после стартового триплета Met вставить дополнительный триплет, кодирующий остаток глицина [8]. В рамках данной работы был получен фермент, соответствующий природному варианту, а также было решено получить вариант фермента с дополнительным остатком аланина на *N*-конце. Все возможные варианты *N*-концевой последовательности ФДГ представлены на рис. 1.

Моделирование структур различных форм ОраFDH с His-tag на *N*- и *C*-конце. Для выбора положения His-tag было проведено моделирование пространственной структуры ОраFDH с помощью алгоритма AlphaFold2. На рис. 2, *a* и *б* представлены модельные структуры с различным расположением остатков гистидина. Вид-

но, что при расположении His-tag на *N*-конце ОраFDH остатки гистидина не затрагивают полость активного центра, где должны связываться кофермент и субстрат. При расположении His-tag на *C*-конце фермента (рис. 2, *б*) видно, что происходит изменение конформации кофермент-связывающего домена. С этим, возможно, и связано значительное увеличение K_M по NAD^+ для ОраFDH_HisC, полученного китайскими коллегами в 2014 г. [7]. Ранее нами были проанализированы структуры ФДГ из бактерий [15] и растений [16] и было показано, что для этих ФДГ более предпочтительным является расположение His-tag на *N*-конце. Результаты анализа были подтверждены экспериментально. Таким образом, учитывая результаты моделирования для ОраFDH, а также экспериментальные данные, полученные для других ФДГ, было принято решение добавлять последовательность из 6 остатков гистидина на *N*-конец ОраFDH.

Создание генно-инженерных конструкций.

Клонирование гена было проведено с помощью полимеразной цепной реакции с соответствующими праймерами на начало и конец гена вначале без добавления His-tag [8]. Для клонирования гена, кодирующего ОраFDH, прямой праймер сконструирован таким образом, что синтез фермента начинается с остатка глицина.

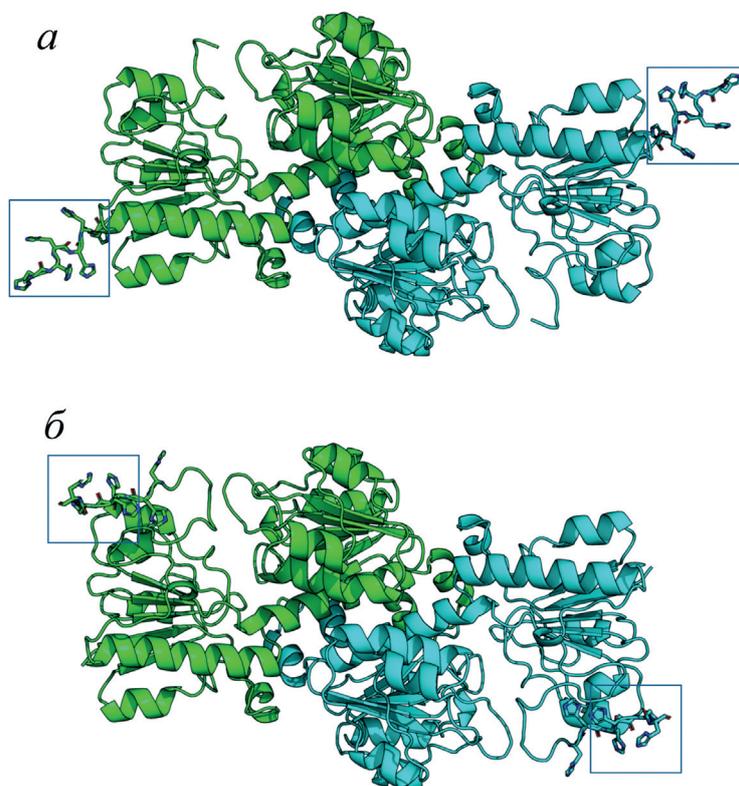


Рис. 2. Модельные структуры ОраFDH с His-tag на *N*-конце (*a*) и на *C*-конце (*б*)

Таблица 2. Данные по экспрессии различных форм ОраFDH

Фермент	Выход фермента по активности, Ед./литр среды	Выход биомассы, г/литр среды	Выход фермента по массе, мг/литр среды	Содержание фермента в клетках, Ед./г клеток
ОраFDH_K	6030	15,4	1005	390
ОраFDH_GK	6744	18,8	1124	360
ОраFDH_AK	6100	17,2	1017	355
ОраFDH_HisN_AK	6500	14,6	1084	445

Обратный праймер был комплементарен 3'-концу гена. Кроме того, на С-конец гена вместо стоп-кодона TGA было вставлено два стоп-кодона (TAATAA) для более эффективной терминации синтеза белка. Также в праймеры были дополнительно введены сайты рестрикции – *NdeI* (CATATG; ОраFOR) и *HindIII* (AAGCTT; ОраREV).

В качестве матрицы для клонирования использовали хромосомную ДНК дрожжей *O. parapolymorpha* DL-1. В результате с помощью ПЦР был получен фрагмент, содержащий ген, кодирующий ОраFDH с дополнительным триплетом остатка глицина. Анализ последовательностей показал, что клонированные фрагменты содержат открытые рамки считывания, соответствующие последовательности гена, кодирующего ОраFDH_GK, и состоят из 1089 пар нуклеотидов, кодирующих полипептид из 363 аминокислотных остатков с молекулярной массой 40 051 Да.

Далее, были получены следующие конструкции: 1) содержащая ген, кодирующий ОраFDH, полностью аналогичный природному – ОраFDH_K, 2) содержащая ген, коди-

рующий ОраFDH с дополнительным триплетом, кодирующим дополнительный остаток аланина на N-конце белка – ОраFDH_AK, и 3) содержащая ген, кодирующий ОраFDH_AK с дополнительной последовательностью, кодирующей 6 остатков гистидина на N-конце – ОраFDH_HisN_AK.

Экспрессия и очистка ОраFDH. Полученные плазмиды с генами, кодирующими ОраFDH, экспрессировали в клетках *E. coli* BL21(DE3) CodonPlus/pLysS, используя в качестве индуктора IPTG. Данные по экспрессии ферментов представлены в табл. 2.

Выходы целевых белков составили около 1 г с одного литра среды, что является очень высоким показателем. Для сравнения, экспрессия FDH из бактерий *Pseudomonas* sp. 101 и дрожжей *C. boidinii* в таких же условиях составляет 0,6 и 0,4 г с одного литра среды соответственно. Очистку ОраFDH_K, ОраFDH_GK и ОраFDH_AK проводили с использованием гидрофобной хроматографии по методике, описанной в разделе «Материалы и методы». На рис. 3 представлены данные аналитического SDS-Na-электрофореза в ПААГ для

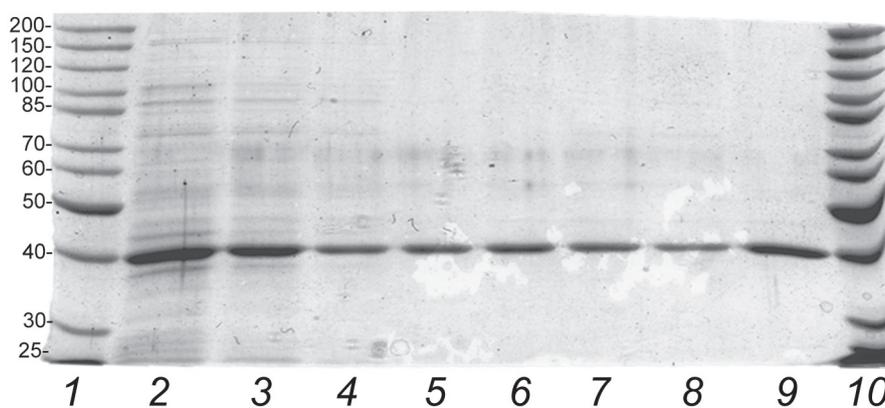


Рис. 3. Аналитический SDS-Na-электрофорез в 12%-ном ПААГ препаратов ОраFDH_GK на различных стадиях очистки. Дорожки: 1 и 10 – маркеры молекулярной массы; 2 – бесклеточный экстракт; 3 – бесклеточный экстракт после термообработки 55 °С, 10 мин; 4 – фракционирование в 30%-ном сульфате аммония фракции перед гидрофобной хроматографией; 5–8 – фракции, собранные после гидрофобной хроматографии; 9 – фракция после обессоливания

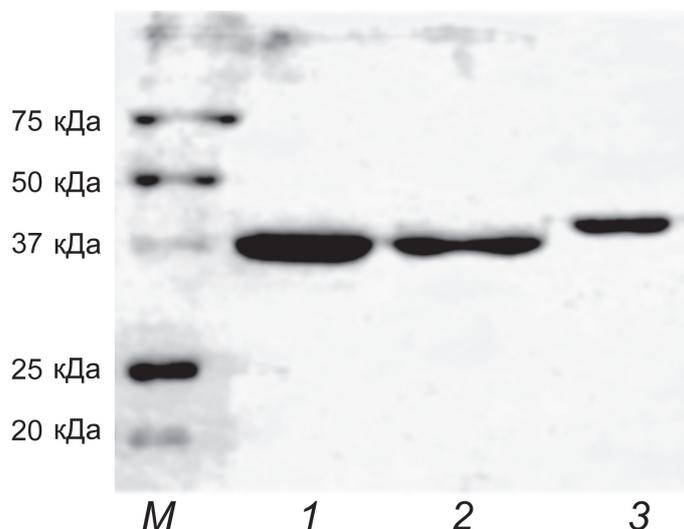


Рис. 4. Аналитический SDS-Na-электрофорез в 12%-ном ПААГ очищенных препаратов ОpaFDH. Дорожки: М – маркер, 1 – ОpaFDH_AK, 2 – ОpaFDH_K, 3 – ОpaFDH_HisN_AK

ОpaFDH_GK на разных стадиях очистки. Видно, что субъединица полученного рекомбинантного белка имеет молекулярную массу ~ 40 кДа и чистота препарата составляет не менее 95%. Очистку ОpaFDH_His_AK проводили с использованием металл-хелатной хроматографии. На рис. 4 представлены данные SDS-электрофореза в ПААГ для препаратов ферментов ОpaFDH_AK, ОpaFDH_K и ОpaFDH_His_AK. Видно, что все ферменты имеют высокую степень чистоты.

Кинетические параметры ОpaFDH. В табл. 3 представлены значения кинетических параметров для ОpaFDH и мутантных форм с модификациями *N*-концевой последовательности в сравнении с ФДГ из других источников. Кинетические параметры были измерены при pH 7,0 и 30 °С с использованием различных концентраций NAD^+ и HCOO^- .

Как видно из табл. 3, ОpaFDH по своим значениям K_M сравнима с растительной ФДГ из *Glycine max*. Однако за счет высокой каталитической константы каталитическая эффективность по NAD^+ исследуемого фермента имеет максимальное значение. Именно кинетические параметры по NAD^+ важны для применения ФДГ на практике, поскольку чем меньше K_M по NAD^+ , тем меньшее количество кофермента необходимо использовать в реальном процессе. Из табл. 3 также видно, что ОpaFDH с His-tag на *C*-конце, полученная в работе Yu et al. [7], имеет гораздо большее значение $K_M^{\text{NAD}^+}$. Изменения последовательности *N*-конца ОpaFDH, а также введенная нами гистидиновая метка на *N*-конец фермента практически не оказывают влияния на кинетические параметры. Таким образом,

наши предположения о том, что наиболее предпочтительным для введения His-tag в последовательность ОpaFDH является *N*-конец фермента, выдвинутые после моделирования соответствующих структур, являются верными. Также нами были проведены измерения кинетических параметров в присутствии 0,5 М NaCl (добавление NaCl положительно сказывается на стабильности белка – см. выше) и оказалось, что добавление 0,5 М NaCl практически не оказывает влияния на кинетические параметры.

Температурная стабильность ОpaFDH. Термоинактивация ОpaFDH_K, ОpaFDH_GK, ОpaFDH_AK и ОpaFDH_HisN_AK была изучена в диапазоне температур 61–66 °С при pH 7,0. На рис. 5 в качестве примера представлены зависимости величин остаточной активности ОpaFDH_GK от времени при различных температурах, а на рис. 6 представлено сравнение зависимостей остаточной активности ФДГ из различных источников при одной температуре. Константа скорости инактивации для ОpaFDH_GK в 2,7, 5,7 и 24,1 раза выше, чем соответственно для ФДГ из *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas* sp. 101 и самого стабильного мутанта PseFDH SM4. ОpaFDH_GK сравнима по термостабильности с ФДГ из других бактериальных источников. Это хорошо согласуется с нашими результатами изучения температурной стабильности методом дифференциальной сканирующей калориметрии [10]. В работе Yu et al. [7] термостабильность ОpaFDH_HisC была измерена при температурах 50, 55, 60 и 65 °С при pH 6,5. Константы скорости инактивации не определяли, но в статье приведен график остаточной активности

Таблица 3. Кинетические свойства различных форм ОраFDH*

Фермент	k_{cat} , с ⁻¹	$K_M^{HCOO^-}$, мМ	$K_M^{NAD^+}$, мкМ	$k_{cat}/K_M^{HCOO^-}$, мМ ⁻¹ ·с ⁻¹	$k_{cat}/K_M^{NAD^+}$, мкМ ⁻¹ ·с ⁻¹
PseFDH [1]	7,3	6,5	65	1,1	0,11
SauFDH [8]	25	130	220	0,2	0,11
MorFDH [1]	7,3	7,5	80	1,0	0,09
MycFDH [1]	7,3	6,0	89	1,2	0,08
BstFDH [17]	1,7	55	1430	0,03	0,001
BacFDH [18]	6,7	19,6	91	0,3	0,07
CboFDH [1]	3,7	5,9	37	0,6	0,10
ОраFDH_GK [8]	4,6 ± 0,4	1,3 ± 0,1	14,0 ± 0,6	3,5	0,33
ОраFDH_AK**	4,3 ± 0,3	2,2 ± 0,1	20,5 ± 0,7	2,0	0,21
ОраFDH_K**	4,4 ± 0,6	2,0 ± 0,1	13,0 ± 1,0	2,2	0,34
ОраFDH_HisN_AK**	4,3 ± 0,2	2,2 ± 0,2	17,0 ± 1,0	2,0	0,25
ОраFDH_HisN_AK***	4,5 ± 0,3	2,5 ± 0,3	20,0 ± 1,0	1,8	0,23
ОраFDH_HisC [7]	2,3	0,8	83	2,8	0,03
SceFDH [8]	6,5	5,5	36	1,2	0,18
AthFDH [8]	3,8	2,8	50	1,4	0,08
SoyFDH [8]	2,9	1,5	13	1,9	0,22
PraFDH [8]	3,4	2,6	39	1,3	0,09
LjaFDH [19]	1,2	6,1	26	0,2	0,05

Примечание. * Сокращения: PseFDH – ФДГ из бактерий *Pseudomonas* sp 101; SauFDH – ФДГ из золотистого стафилококка *Staphylococcus aureus*; MorFDH – ФДГ из бактерий *Moraxella* sp. C2; MycFDH – ФДГ из бактерий *Mycobacterium vaccae*; BstFDH – ФДГ из бактерий *Burkholderia stabilis* (проявляет активность с NADP⁺); BacFDH – ФДГ из бактерий *Bacillus* sp. F1; CboFDH – ФДГ из дрожжей *C. boidinii*; ОраFDH_HisC – ФДГ из дрожжей *O. parapolymorpha*; SceFDH – ФДГ из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*; AthFDH – ФДГ из растения *A. thaliana*; SoyFDH – ФДГ из сои *Glycine max*; PraFDH – ФДГ из мха *Physcomitrella patens*; LjaFDH – ФДГ из *Lotus japonicus*.

** Данная работа.

*** + 0,5 М NaCl.

от времени, на основании которого можно оценить остаточную активность. Действительно, через 2 ч термообработки при 60 °С у ОраFDH_HisC остается менее 20% исходной активности, что в пределах ошибки согласуется с нашими данными.

На рис. 7 представлены зависимости остаточной активности от времени для мутантных ферментов при 64 °С. Видно, что добавление остатка аланина на N-конец ОраFDH приводит к увеличению температурной стабильности фермента. Поэтому было решено добавлять гистидиновую метку именно к этой мутантной форме. Из рис. 7 видно, что добав-

ление His-tag снижает стабильность белка и приводит этот параметр примерно на уровень фермента без дополнительного остатка или же со вставкой остатка глицина. Увеличение ионной силы за счет добавления 0,5 М NaCl увеличивает стабильность фермента с His-tag до уровня ОраFDH_AK без гистидиновой метки. Таким образом, определение температурной стабильности ферментов показало, что добавление His-tag на N-конец ОраFDH_AK несколько снижает стабильность, но добавление NaCl нивелирует этот эффект. Стабилизующий эффект ионной силы в случае ОраFDH хорошо согласуется с данными

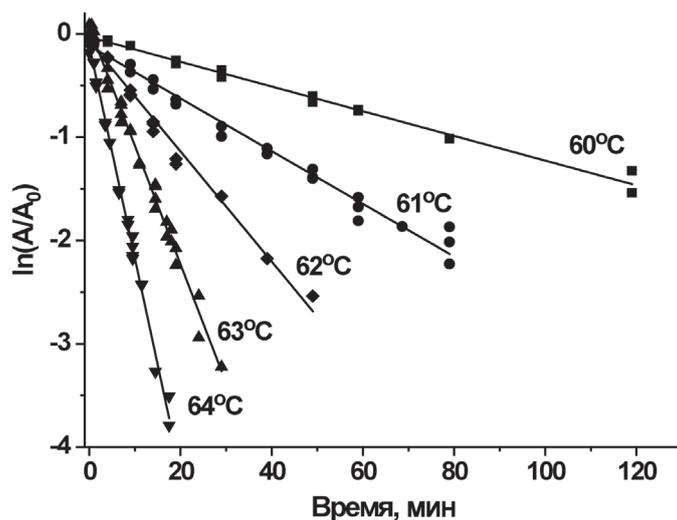


Рис. 5. Зависимость логарифма остаточной активности ОраFDH_GK от времени при нескольких температурах; 0,1 М натрий-фосфатный буфер (pH 7,0)

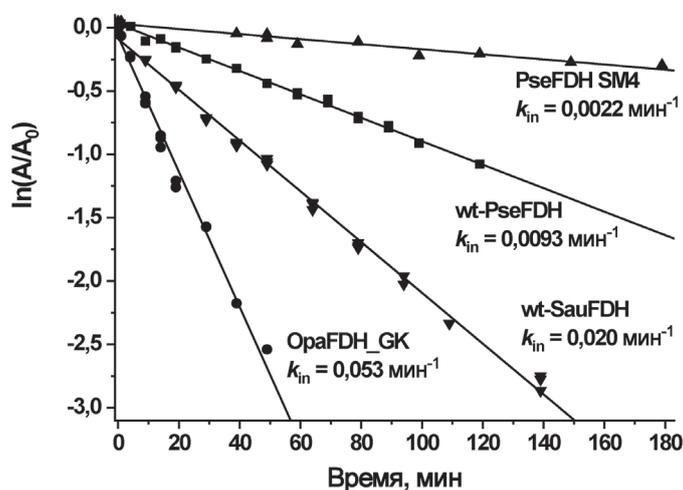


Рис. 6. Зависимость логарифма остаточной активности FDH из различных источников при 62 °С; 0,1 М натрий-фосфатный буфер (pH 7,0)

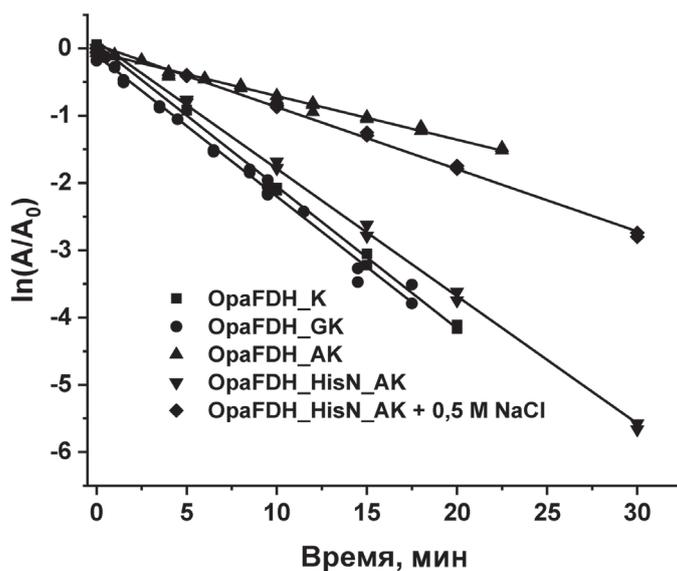


Рис. 7. Зависимость остаточной активности мутантных ОраFDH и фермента дикого типа ОраFDH_K от времени инкубирования при 64 °С в полулогарифмических координатах (0,1 М натрий-фосфатный буфер, pH 7,0)

по эффекту стабилизации для растительных ФДГ при повышении ионной силы за счет увеличения концентрации фосфат-иона. Так, для рекомбинантных SoyFDH и AthFDH эффект стабилизации за счет увеличения концентрации фосфатного буфера был более чем 5-кратным [20]. Следует отметить, что в отличие от фосфат-иона хлорид-ион снижает температурную стабильность других исследованных формиатдегидрогеназ (собственные неопубликованные данные). Данный случай является первым, когда увеличение концентрации NaCl привело к стабилизации ФДГ.

Зависимости величин остаточной ферментативной активности от времени, полученные при различных температурах, были линейны в полулогарифмических координатах $\ln(A/A_0)$ от времени. Из тангенса угла наклона прямых рассчитываются константы скорости инактивации (k_{in}) первого порядка. Изменение концентрации белка в широком диапазоне (0,1–2,5 мг/мл) не влияет на величину k_{in} , т.е. инактивация всех четырех наших вариантов ОраFDH при повышенных температурах является истинно мономолекулярным процессом. Мономолекулярный механизм термоинактивации свидетельствует, что разворачивание белковой глобулы происходит без предварительной диссоциации димерной молекулы фермента на отдельные субъединицы. Полученные значения констант скорости термоинактивации при различных температурах представлены в табл. 4.

В случае истинной мономолекулярности процесса зависимость константы скорости инактивации от температуры может быть описана с помощью уравнения теории активированного комплекса [21]. Линейная форма этого уравнения имеет следующий вид:

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

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

где k_B и h – это константы Больцмана и Планка соответственно, R – универсальная газовая постоянная, а ΔH^\ddagger и ΔS^\ddagger – активационные параметры. Нами были изучены соответствующие зависимости константы скорости термоинактивации от температуры для всех мутантов при pH 7. Из них были рассчитаны активационные параметры, которые суммированы в табл. 5.

Согласно данным табл. 5, высокие значения активационных параметров для ОраFDH говорят о значительном изменении температурной стабильности с температурой: при высоких температурах белок будет менее стабилен, при низких температурах – более стабилен. В реальном биотехнологическом процессе температуры выше 50 °C не используются, поэтому белок будет активен более 4–5 ч. Максимальные значения активационных параметров наблюдаются для фермента с дополнительным остатком аланина. При этом добавление His-tag на N-конец белка приводит к снижению активационных параметров до уровня ОраFDH_K и ОраFDH_GK. Добавление 0,5 М NaCl приводит к значительному изменению характера зависимости константы скорости инактивации от температуры – активационные параметры снижаются до уровня SoyFDH, т.е. увеличение ионной силы приводит к снижению влияния температуры на константу скорости термоинактивации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленной работе проведено моделирование структуры ОраFDH с различным расположением гистидиновой метки и показано, что наиболее перспективным для ее

Таблица 4. Константы скорости инактивации различных форм ОраFDH

Фермент	$k_{in}^{61\text{ }^\circ\text{C}},$ мин ⁻¹	$k_{in}^{62\text{ }^\circ\text{C}},$ мин ⁻¹	$k_{in}^{63\text{ }^\circ\text{C}},$ мин ⁻¹	$k_{in}^{64\text{ }^\circ\text{C}},$ мин ⁻¹	$k_{in}^{65\text{ }^\circ\text{C}},$ мин ⁻¹
ОраFDH_K	0,0258	0,0524	0,1169	0,2110	–
ОраFDH_GK	0,0261	0,0533	0,1147	0,2060	–
ОраFDH_AK	0,005	0,009	0,03	0,07	0,13
ОраFDH_HisN_AK	0,0239	0,0483	0,0951	0,1894	0,3351
ОраFDH_HisN_AK + 0,5 М NaCl	0,0298	0,0433	0,0633	0,0924	0,1451

Таблица 5. Значения активационных параметров процесса термоинактивации ФДГ из различных источников

Фермент	ΔH^\ddagger , кДж/моль	ΔS^\ddagger , Дж/(моль·К)
PseFDH [22]	540 ± 20	1320 ± 40
CboFDH [22]	480 ± 30	1250 ± 80
AthFDH [22]	490 ± 30	1200 ± 70
SoyFDH [22]	370 ± 20	830 ± 60
OpaFDH_GK	670 ± 20	1690 ± 50
OpaFDH_K	660 ± 30	1670 ± 80
OpaFDH_AK	800 ± 40	2070 ± 90
OpaFDH_HisN_AK	620 ± 10	1550 ± 40
OpaFDH_HisN_AK + 0,5 M NaCl	370 ± 10	790 ± 30

введения является *N*-концевая последовательность. Получены рекомбинантные OpaFDH с измененной последовательностью на *N*-конце. Все ферменты получены в активной и растворимой форме с выходом более чем 1 г с одного литра среды. Показано, что изменение *N*-конца, в том числе введение гистидиновой метки, не оказывает значительного влияния на кинетические параметры OpaFDH. При этом введение остатка аланина на *N*-конце приводит к увеличению температурной стабильности фермента. His-tag на *N*-конце OpaFDH_His_AK негативно влияет на температурную стабильность, но этот эффект можно скомпенсировать увеличением ионной силы. Фермент, полученный в рамках данной работы, демонстрирует высокую температурную стабильность, превосходя все известные в настоящее время эукариотические ФДГ. OpaFDH может быть эффективно использована в качестве биокатализатора в процессах регенерации кофактора,

а также для детекции NAD^+ в биологических жидкостях за счет своих высоких значений каталитической эффективности и температурной стабильности.

Вклад авторов. А.А.П., В.И.Т. – концепция и руководство работой; С.А.З., Р.П.К., Л.А.Ш., Д.Л.А., Е.В.П., С.С.С. – проведение экспериментов; А.А.П., Л.А.Ш., В.И.Т. – обсуждение результатов исследования; А.А.П. и Л.А.Ш. – написание текста; А.А.П., С.С.С., В.И.Т. – редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена частично в рамках государственного научного задания.

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

1. Tishkov, V. I., and Popov, V. O. (2004) Catalytic mechanism and application of formate dehydrogenase, *Biochemistry (Moscow)*, **69**, 1252-1267, doi: 10.1007/s105410050071x.
2. 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, doi: 10.32607/20758251-2011-3-4-38-54.
4. Tishkov, V. I., Pometun, A. A., and Savin, S. S. (2023) Formate dehydrogenase: from NAD(P)H regeneration to targeting pathogen biofilms, composing highly efficient hybrid biocatalysts and atmospheric CO_2 fixation, *Moscow Univ. Chem. Bull.*, **78**, 151-169, doi: 10.3103/S0027131423040077.
5. Kragl, U., Kruse, W., Hummel, W., and Wandrey, C. (1996) Enzyme engineering aspects of biocatalysis: cofactor regeneration as example, *Biotechnol. Bioeng.*, **52**, 309-319, doi: 10.1002/(SICI)1097-0290.
6. Tishkov, V. I., Galkin, A. G., Marchenko, G. N., Tsygankov, Y. D., and Egorov, A. M. (1993) Formate dehydrogenase from methylotrophic bacterium *Pseudomonas* sp. 101: gene cloning and expression in *Escherichia coli*, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **18**, 201-207.

7. 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.
8. Tishkov, V. I., Pometun, A. A., Stepashkina, A. V., Fedorchuk, V. V., Zarubina, S. A., Kargov, I. S., Atroshenko, D. L., Parshin, P. D., Kovalevski, R. P., Boiko, K. M., Eldarov, M. A., D'Oronzio, E., Fachris, 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.
9. Pometun, A. A., Kleymenov, S. Y., 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 by differential scanning calorimetry, *Moscow Univ. Chem. Bull.*, **73**, 80-84, doi: 10.3103/S002713141802013X.
10. Pometun, A. A., Boyko, K. M., Zubanova, S. A., Nikolaeva, A. Yu., Atroshenko, D. L., Savin, S. S., and Tishkov, V. I. (2021) Preparation of recombinant formate dehydrogenase from thermotolerant yeast *Ogataea parapolymorpha* and crystallization of its apo- and holo-forms, *Moscow Univ. Chem. Bull.*, **76**, 49-55, doi: 10.3103/S0027131421010120.
11. 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.
12. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. (1991) *Справочник биохимика*, Мир, Москва, ISBN 5-03-001032-7.
13. Varshavsky, A. (2011) The N-end rule pathway and regulation by proteolysis, *Protein Sci.*, **20**, 1298-1345, doi: 10.1002/pro.666.
14. Klyushnichenko, V., Tishkov, V., and Kula, M.-R. (1997) Rapid SDS-gel capillary electrophoresis for the analysis of recombinant NADP⁺-dependent formate dehydrogenase during expression in *E. coli* cells and purification, *J. Biotechnol.*, **58**, 187-195, doi: 10.1016/S0168-1656(97)00149-1.
15. Pometun, A. A., Parshin, P. D., Galanicheva, N. P., Uporov, I. V., Atroshenko, D. L., Savin, S. S., and Tishkov, V. I. (2020) Influence of His6 sequence on the properties of formate dehydrogenase from bacterium *Pseudomonas* sp. 101, *Moscow Univ. Chem. Bull.*, **75**, 250-257, doi: 10.3103/S0027131420040057.
16. Shaposhnikov, L. A., Savin, S. S., Atroshenko, D. L., Chubar, T. A., Pometun, E. V., Tishkov, V. I., and Pometun, A. A. (2023) Engineering the N-terminal sequence of *Glycine max* soybean formate dehydrogenase, *Moscow Univ. Chem. Bull.*, **78**, 220-230, doi: 10.3103/S0027131423040053.
17. Hatrongjit, R., and Packdibamrung, K. (2010) A novel NADP⁻-dependent formate dehydrogenase from *Burkholderia stabilis* 15516: Screening, purification and characterization, *Enzyme Microb. Technol.*, **46**, 557-561, doi: 10.1016/j.enzmictec.2010.03.002.
18. Ding, H. T., Liu, D. F., Li, Z. L., Du, Y. Q., Xu, X. H., and Zhao, Y. H. (2011) Characterization of a thermally stable and organic solvent-adaptative NAD⁺-dependent formate dehydrogenase from *Bacillus* sp. F1, *J. Appl. Microbiol.*, **111**, 1075-1085, doi: 10.1111/j.1365-2672.2011.05124.x.
19. Andreadeli, A., Fletmetakis, E., Axarli, I., Dimou, M., Udvardi, M. K., Katinakis, P., and Labrou, N. E. (2009) Cloning and characterization of *Lotus japonicus* formate dehydrogenase: a possible correlation with hypoxia, *Biochim. Biophys. Acta*, **1794**, 976-984, doi: 10.1016/j.bbapap.2009.02.009.
20. Pometun, A. A., Voinova, N. S., Pometun, E. V., Savin, S. S., and Tishkov, V. I. (2018) Effect of medium pH and ion strength on the thermal stability of plant formate dehydrogenases, *Moscow Univ. Chem. Bull.*, **73**, 199-203, doi: 10.3103/S0027131418040077.
21. Cornish-Bowden, A. (2012) in *Fundamentals of Enzyme Kinetic* 4th Ed., Wiley-Blackwell, Singapore, p. 18-20.
22. 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.

**NAD⁺-DEPENDENT FORMATE DEHYDROGENASE
FROM THE THERMOTOLERANT YEAST *Ogataea parapolymorpha*:
PROPERTIES AND PROTEIN ENGINEERING
OF THE N-TERMINAL SEQUENCE**

**A. A. Pometun^{1,2*}, L. A. Shaposhnikov^{1,2}, S. A. Zubanova², R. P. Kovalevskii²,
D. L. Atroshenko^{1,2}, E. V. Pometun³, S. S. Savin², and V. I. Tishkov^{1,2*}**

¹ *Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences, 119071 Moscow, Russia;
e-mail: aapometun@gmail.com, vitishkov@gmail.com*

² *Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia*

³ *Sechenov First Moscow State Medical University, 119991 Moscow, Russia*

Previously, the gene of formate dehydrogenase (FDH, EC 1.2.1.2) from the thermotolerant methylotrophic yeast *Ogataea parapolymorpha* DL 1 (OpaFDH) was cloned in our laboratory. The recombinant enzyme with an additional glycine amino acid residue (OpaFDH_GK) was obtained in *Escherichia coli* cells in an active and soluble form with a yield of more than 1 g per liter of medium. In the present work, a detailed comparison of this enzyme with FDH from other sources was carried out. Among eukaryotic formate dehydrogenases, OpaFDH has the highest thermal stability. To elucidate the effect of the N-terminal residue on the properties of the enzyme, OpaFDH_K (identical to natural) and OpaFDH_AK variants containing an additional Ala residue at the N-terminus were also obtained. It was shown that the addition of an Ala residue to the N-terminus reduces the rate constant of thermal inactivation four times compared with the addition of a Gly residue. The addition of six more histidine residues to the N-terminus of OpaFDH_AK leads to an acceleration of purification, practically does not affect the kinetic parameters, but somewhat reduces the temperature stability, which, however, can be restored to the level of OpaFDH_AK by adding 0.5 M NaCl.

Keywords: formate dehydrogenase, *Ogataea parapolymorpha* DL 1, thermotolerant yeast, expression in *E. coli*, catalytic properties, purification, temperature stability, site-directed mutagenesis