

На правах рукописи



САВИН
Святослав Сергеевич

**НОВЫЕ БИОКАТАЛИЗАТОРЫ
РЕГЕНЕРАЦИИ NADH НА ОСНОВЕ
ФОРМИАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ**

03.01.06 – биотехнология
(в том числе бионанотехнологии)

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва - 2013

Работа выполнена в лаборатории молекулярной инженерии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биохимии им. А.Н. Баха Российской академии наук

Научный руководитель:

доктор химических наук, профессор
Тишков Владимир Иванович

Официальные оппоненты:

Леонтьевский Алексей Аркадьевич
доктор биологических наук, профессор,
Федеральное государственное бюджетное учреждение
науки Институт биохимии и физиологии
микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской
академии наук, заместитель директора по научной
работе, заведующий лабораторией микробной
энзимологии

Егоров Сергей Николаевич
доктор биологических наук, Федеральное
государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего профессионального образования
«Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова», биологический факультет,
доцент кафедры молекулярной биологии

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение
науки Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук

Защита диссертации состоится 24 сентября 2013 года в 15.30 на заседании Совета Д 501.001.21 при Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, д.1, стр. 12, биологический факультет МГУ, ауд. М-1.

Тел. 8(495)939-54-83, эл. почта: npiskunkova@rambler.ru

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной библиотеке Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Автореферат разослан ____ августа 2013 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета Д 501.001.21,
кандидат биологических наук

Пискункова Н.Ф.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Многие органические соединения содержат от одного до нескольких хиральных центров, т.е. они могут существовать в виде двух и более энантиомеров. Как правило, полезной биологической активностью обладает только один из возможных энантиомеров, в то время как остальные могут оказывать сильный негативный эффект. Ярким примером является препарат талидомид, *R*-изомер которого активно рекламировали как седативный препарат для беременных женщин. Позднее было обнаружено, что в организме из-за его рацемизации образуется *S*-форма, которая вызывала неправильное развитие плода. Поэтому синтез оптически активных (хиральных) соединений является одним из наиболее активно развивающихся направлений современного органического синтеза. По данным BCC Research LLC (<http://www.bccresearch.com/report/chiral-products-technology-global-markets-bio012f.html>) рынок хирального синтеза в 2011 году составлял 3,9 млрд., а в 2016 году составит 5,7 млрд. долларов США.

Согласно требованиям Администрации США по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных препаратов (Food and Drug Administration of the USA) оптическая чистота по каждому хиральному центру в лекарственном препарате должна составлять не менее 99%. Очень немногие процессы классического химического асимметрического синтеза позволяют получать оптически активные соединения такой степени чистоты. Поэтому безусловным выбором при разработке новых процессов хирального синтеза является использование ферментов. Существует два принципиальных подхода биокаталитического получения оптически активных соединений - разделение рацемата на энантиомеры и асимметрический синтез. В случае первого процесса выход целевого продукта не может быть больше 50%, а при асимметрическом синтезе выход составляет до 100%. Поэтому доля последнего подхода в общем объеме синтеза хиральных соединений неуклонно растет из года в год.

Среди ферментов различных классов, используемых в биокаталитическом асимметрическом синтезе, наиболее высокой стереоселективностью обладают оксидоредуктазы, в первую очередь NAD(P)⁺-зависимые ферменты (дегидрогеназы, редуктазы, монооксигеназы и др.). Например, алкогольдегидрогеназа из пекарских дрожжей совершает всего одну стереоспецифическую ошибку на $7 \cdot 10^9$ (!!!) каталитических циклов (Weinhold, E.G. et al, *PNAS*, 1991, 88, 8420). Ключевым фактором, сдерживавшим применение дегидрогеназ, была очень высокая стоимость восстановленной формы кофермента - NADH и, особенно, NADPH. Эта проблема решается введением в реакционную среду второго фермента, который регенерирует окисленную форму кофермента в восстановленную. Многочисленные исследования показали, что одним из наиболее оптимальных ферментов для регенерации NADH является NAD⁺-зависимая формиатдегидрогеназа* (ФДГ, КФ 1.2.1.2). В настоящее время самый крупнотоннажный процесс хирального синтеза с использованием индивидуальных ферментов - получение *tert*-L-лейцина, включает регенерацию восстановленного кофермента с помощью ФДГ из дрожжей *Candida boidinii* (реализован фирмой Degussa в конце 90-х годов прошлого века).

Формиатдегидрогеназы, используемые для регенерации NADH, состоят из двух идентичных субъединиц и не содержат кофакторов или простетических групп. Они широко распространены в природе и играют важную физиологическую роль в различных организмах,

* Принятые сокращения: ФДГ - формиатдегидрогеназа; PseФДГ, CboФДГ, SoyФДГ и AthФДГ - рекомбинантные ФДГ из бактерий *Pseudomonas* sp.101, дрожжей *Candida boidinii*, растений *Arabidopsis thaliana* и сои *Glycine max* соответственно.

включая патогены, вызывающие туляремию, легионеллез и др. В метанолутилизирующих микроорганизмах синтез ФДГ индуцируется при росте на метаноле, в патогенах - при росте в виде биопленок. В растениях ФДГ находится не в цитоплазме, а в митохондриях. При стрессовых воздействиях содержание ФДГ достигает 9% от всех митохондриальных белков.

В нашей лаборатории ведутся систематические исследования ФДГ из различных источников. Были клонированы гены и созданы системы экспрессии рекомбинантных ФДГ из бактерий, дрожжей и растений. Для большинства ферментов получены кристаллы и решена структура как свободных ферментов (апо-форма), так и их комплексов с субстратами и ингибиторами. Для создания биокатализаторов регенерации NADH в качестве источника фермента была выбрана метилотрофная бактерия *Pseudomonas* sp.101 (штамм был любезно предоставлен в 70-х годах прошлого века сотрудниками кафедры микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова). Методом направленного мутагенеза была получена мутантная PseФДГ GAV, которая превосходит мутантную ФДГ из *S. boidinii*, разработанную фирмой Degussa, по активности в 1,7 раза, а по термостабильности - более, чем в 100 раз. Однако работы по созданию биокатализаторов регенерации NADH далеки от завершения. Это связано с тем, что таких биокатализаторов должно быть два типа. Из уравнения Михаэлиса следует, что при высоких, насыщающих концентрациях субстрата главным показателем для фермента является величина каталитической константы k_{cat} . В случае использования низких концентраций субстрата главную роль играет не величина k_{cat} , а каталитическая эффективность - отношение каталитической константы к константе Михаэлиса k_{cat}/K_M . Поскольку самая высокая величина k_{cat} у бактериальных ФДГ, то для биокатализатора регенерации NADH первого типа несомненным лидером является PseФДГ GAV, которая также превосходит все известные ФДГ по термостабильности. Однако у этого фермента можно дополнительно повысить операционную (химическую) стабильность за счет замен остатков цистеина. В случае биокатализатора второго типа наиболее перспективной является рекомбинантная ФДГ из сои *Glycine max* (SoyФДГ), которая имеет самые низкие значения K_M среди всех описанных в литературе ФДГ.

Данная работа посвящена решению важных и актуальных проблем современной биотехнологии – созданию новых биокатализаторов регенерации NADH для применения в процессах хирального синтеза.

Цели исследования. Целью данной работы было проведение систематических исследований формиадегидрогеназ из различных источников и создание на основе полученных данных новых биокатализаторов регенерации NADH с улучшенными свойствами. Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

- изучение термостабильности используемых на практике рекомбинантных формиадегидрогеназ микроорганизмов при различных pH и ионной силе;
- разработка высокочувствительной методики детекции формиадегидрогеназ;
- анализ структуры и выбор положений для введения аминокислотных замен в формиадегидрогеназах из сои *Glycine max* и бактерии *Pseudomonas* sp.101;
- получение мутантных растительной и бактериальной формиадегидрогеназ и изучение их каталитических свойств и термостабильности;
- разработка метода оценки химической стабильности формиадегидрогеназ;
- исследование с помощью разработанного метода химической стабильности рекомбинантных ФДГ дикого типа и мутантных ферментов.

Научная новизна. Проведены систематические исследования по влиянию pH среды и ионной силы на термостабильность формиадегидрогеназ. Получены новые данные по взаимосвязи структура-активность и структура-стабильность для двух формиадегидрогеназ.

Показано важное влияние остатка Phe290 в SoyФДГ и остатка Cys145 в PseФДГ на каталитическую активность и стабильность. Впервые проведено сравнительное исследование химической стабильности ФДГ из разных источников. Показано, что ФДГ, биосинтез которых индуцируется в условиях стресса, обладают повышенной стабильностью против инактивации пероксидом водорода.

Практическая значимость работы. Получены два типа новых биокатализаторов регенерации NADH на основе мутантных ФДГ из сои *G. max* и бактерии *Pseudomonas* sp.101. В случае мутантов SoyФДГ были повышены каталитическая активность и термостабильность без существенного изменения (а в ряде случаев и с улучшением) констант Михаэлиса как по NAD⁺, так и по формиату. Данный тип биокатализатора оптимален для использования в условиях низких концентраций субстрата. В случае новых мутантных PseФДГ были улучшены температурная и химическая стабильность без ухудшения каталитических свойств. Лучший мутант PseФДГ GASV имеет самую высокую термостабильность среди всех описанных в литературе формиатдегидрогеназ (как дикого типа, так и мутантных ферментов). Данный тип биокатализатора наиболее подходит для процесса регенерации NADH в реакторах периодического действия. Разработаны методы детекции микроколичеств формиатдегидрогеназ, а также оценки их химической стабильности.

Апробация работы. Основные результаты диссертационной работы были представлены на следующих международных конференциях: 38th FEBS Congress (St.-Petersburg, 2013), 13th и 14th International Biotechnology Symposiums (Dalian, China, 2008 и Rimini, Italy, 2010), IV Съезд Российского общества биохимиков и молекулярных биологов (Новосибирск, 2008), XVIII и XIX Менделеевские съезды по общей и прикладной химии (Москва, 2007 и Волгоград, 2011), International Conferences of International Network of Protein Engineering Centres (INPEC) (INPEC-2009 - Ubatuba, State Sao Paulo, Brasil, 2009; INPEC-2010 - Sweden, Uppsala, 2010 и INPEC-2012 - Taipei, Taiwan, 2012), 7th, 8th и 9th International Conferences "Biocatalysis: Fundamentals & Applications" (Moscow-St.Petersburg, 2007; Arkhangelsk, 2009 и Moscow, 2013), 8th и 9th International Conferences on Protein Stabilization (ProStab-2009, Graz, Austria, 2009 и ProStab-2012, Lisbon, Portugal, 2012), IV, V, VI и VII-ой Московские международные конгрессы "Биотехнология: состояние и перспективы развития" (Москва, 2007, 2009, 2011 и 2013), VIII, X, XI и XII Международные конференции молодых ученых «Леса Евразии» (Сочи, 2008; Москва, 2010; Брянск, 2011 и Браслав, Белоруссия и Игналина, Литва, 2012), II-ая Международная конференция «Физико-химическая биология», посвященная 85-летию академика Д.Г. Кнорре (Новосибирск, 2011), V International Meeting "Early events in Human Pathologies" (Listvyanka, Baikal, Russia, 2012).

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 8 статей (все в журналах, индексируемых в Международных базах данных Web of Science, Pub Med и Scopus, входят в Перечень рецензируемых научных изданий ВАК РФ) и 27 тезисов докладов конференций, поданы две заявки на выдачу патента РФ на изобретение.

Структура и объем работы. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы. Диссертация изложена на 149 страницах и содержит 68 рисунков, 24 таблицы и 147 ссылок.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ

Изучение термостабильности CboФДГ и PseФДГ GAV

Первый этапом было изучение термостабильности рекомбинантной ФДГ из дрожжей *S. boidinii* CboФДГ и мутантного фермента из бактерии *Pseudomonas* sp.101 PseФДГ GAV.

Как уже отмечалось выше, именно эти формиатдегидрогеназы применяются на практике, однако, до сих пор в литературе отсутствуют систематические данные по

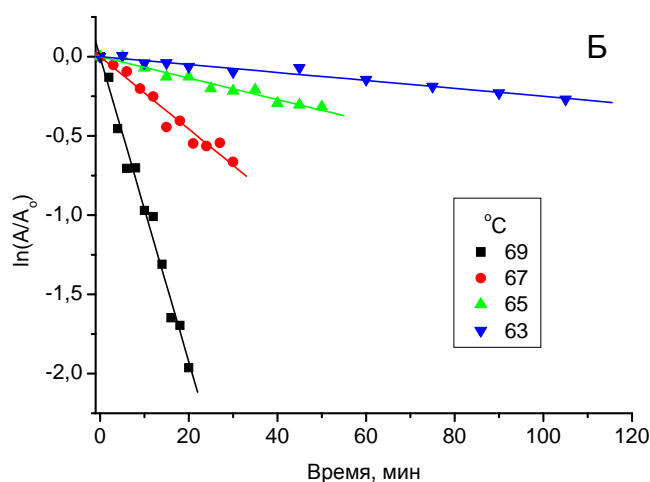
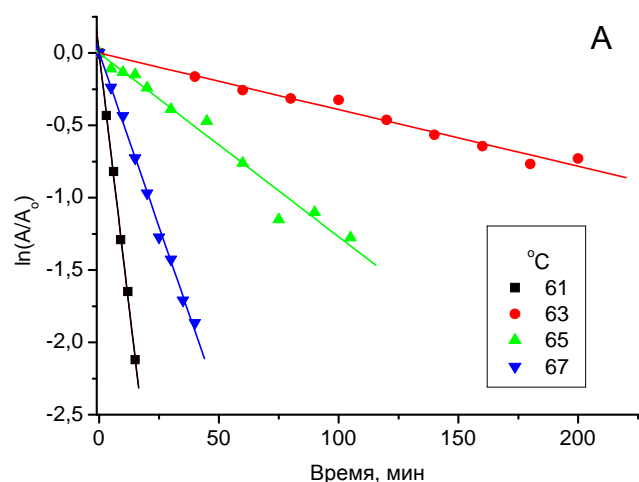


Рис. 1. Зависимости остаточной активности PseFDG GAV от времени в координатах $\ln(A/A_0) - t$, с при нескольких температурах. А - 0,1 М и Б - 1,0 М Na-фосфатный буфер, pH 8,0.

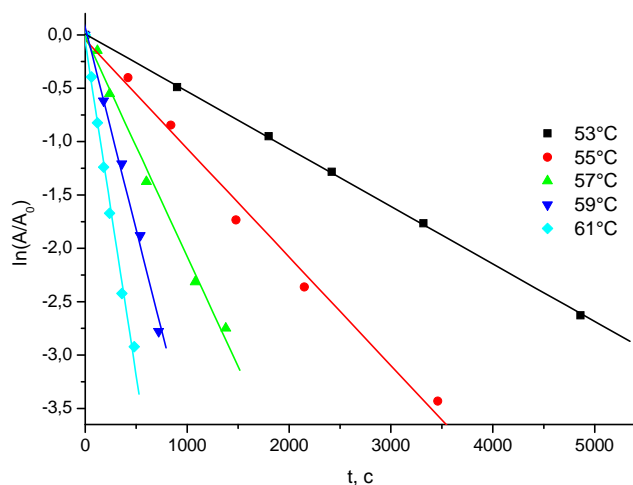


Рис. 2. Зависимость остаточной активности SboFDG от времени в координатах $\ln(A/A_0) - t$, при нескольких температурах, 0,1 М Na-фосфатный буфер, pH 6,0.

отсутствуют систематические данные по количественной характеристике термостабильности SboFDG. Для PseFDG GAV есть данные по кинетике инактивации и дифференциальной сканирующей калориметрии, однако, все они были получены только при pH 7,0.

Известно много методов по изучению термостабильности белков, однако, с точки зрения практического применения фермента наиболее правильным и полезным является исследование кинетики термоинактивации. Такие эксперименты проводятся при повышенных температурах, поскольку, обработав экспериментальные значения констант скорости инактивации в рамках теории активированного комплекса можно получить количественные параметры уравнения и потом рассчитывать величины констант для любой температуры.

Кинетика термоинактивации PseFDG GAV была исследована при pH 8,0 и 61-69°C и различных концентрациях фосфатного буфера (0,02 – 1,5М) На рис. 1 представлены зависимости величин остаточной ферментативной активности от времени при различных температурах и концентрациях буфера 0,1 и 1,0 М соответственно. Зависимости величин остаточной активности от времени полулогарифмических координатах $\ln(A/A_0) - t$ (рис. 1) во всем изученном диапазоне температур и концентраций буфера представляли собой прямые, тангенс угла которых (константа скорости инактивации) не зависел от концентрации фермента, что однозначно свидетельствовало о мономолекулярном механизме процесса инактивации.

Аналогичные эксперименты были проведены для SboFDG при трех значениях pH - 6,0, 7,0 и 8,0. Во всем диапазоне pH и концентраций буфера также наблюдался первый порядок инактивации

(рис. 2). Следует отметить, что в зависимости от температуры константы скорости инактивации для СбоФДГ были от 50 до 100 раз выше по сравнению с таковыми для PseФДГ GAV.

На рис. 3 и 4 представлены зависимости величины константы скорости инактивации от концентрации фосфатного буфера при pH 7,0 и 8,0 для PseФДГ GAV и для СбоФДГ соответственно. В обоих случаях наблюдается увеличение стабильности ферментов с увеличением ионной силы, однако эффект стабилизации разный. В случае PseФДГ GAV при переходе от pH 7,0 к 8,0 наблюдается уменьшение стабильности примерно в три раза при концентрации буфера 0,1 М, однако при концентрациях буфера выше 0,2 М стабильность фермента при разных pH практически одинакова.

В случае СбоФДГ эффект дестабилизации при повышении pH намного выше. Для того, чтобы время и степень инактивации при pH 8,0 сделать сопоставимыми с таковыми при pH 7,0 нами были выбраны разные температуры - 59 и 61°C соответственно. Кроме того, эффект стабилизации при высокой концентрации буфера был при pH 8,0 был намного выше, чем при pH 7,0 (100 и 7 раз соответственно). Анализ четвертичной структуры СбоФДГ позволяет объяснить эффект стабилизации фермента более чем в 3 раза при концентрации фосфатного буфера 0,1 М за счет мутации Arg178Ser (US Patent US 6 242 234). Дело в том, что в ферменте дикого типа (wt-СбоФДГ) рядом с остатком Arg178 расположены еще два остатка Arg в положениях 174 и 182. Их положительно заряженные гуанидиновые группы расположены от таковой у Arg178 на расстоянии 4,05 и 4,78 Å соответственно. Это достаточно большие расстояния, и в случае взаимодействия только двух остатков (положительных зарядов) сила отталкивания будет не очень велика, но таких остатков (и положительных зарядов) три, вследствие чего эффективность отталкивания сильно возрастает. Замена Arg178Ser приводит к полному удалению электростатического отталкивания положительных зарядов и, кроме того, образуется новая водородная связь между остатками Arg182 и Ser178, что и обеспечивает стабилизацию за счет этой замены при концентрации буфера 0,1 М. При увеличении концентрации фосфатного буфера происходит экранирование положительных зарядов отрицательно заряженными ионами фосфата, вследствие чего возрастает и стабильность фермента дикого типа.

Константы скоростей инактивации при разных температурах были представлены в координатах линейной формы уравнения теории активированного комплекса, описывающего зависимость константы скорости от температуры для мономолекулярного процесса. Во всех случаях были получены прямые (рис. 5 и 6).

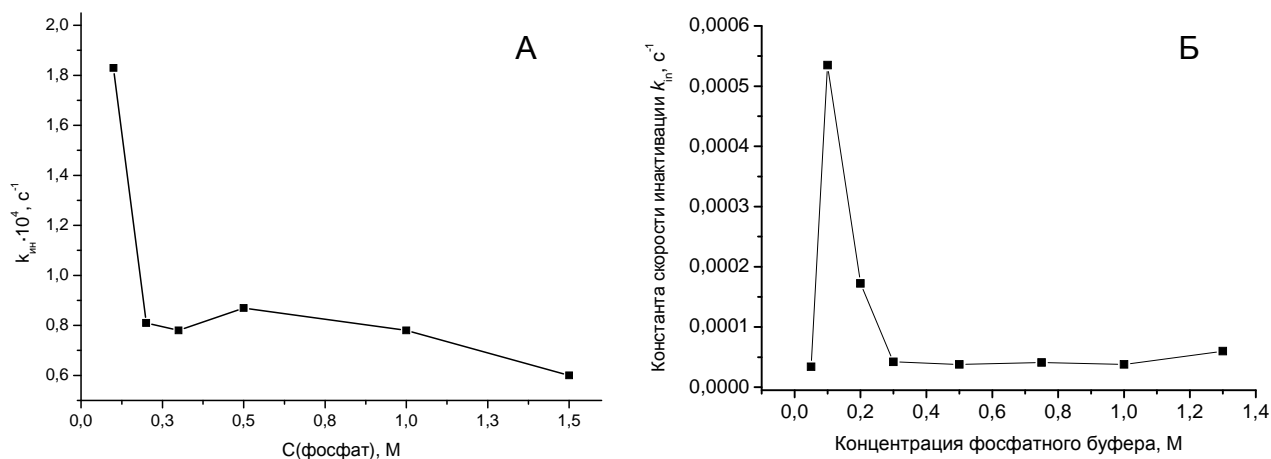


Рис. 3. Зависимости величины константы скорости инактивации PseФДГ GAV от концентрации фосфат-иона при pH 7,0 (А) и 8,0 (Б) соответственно (63°C).

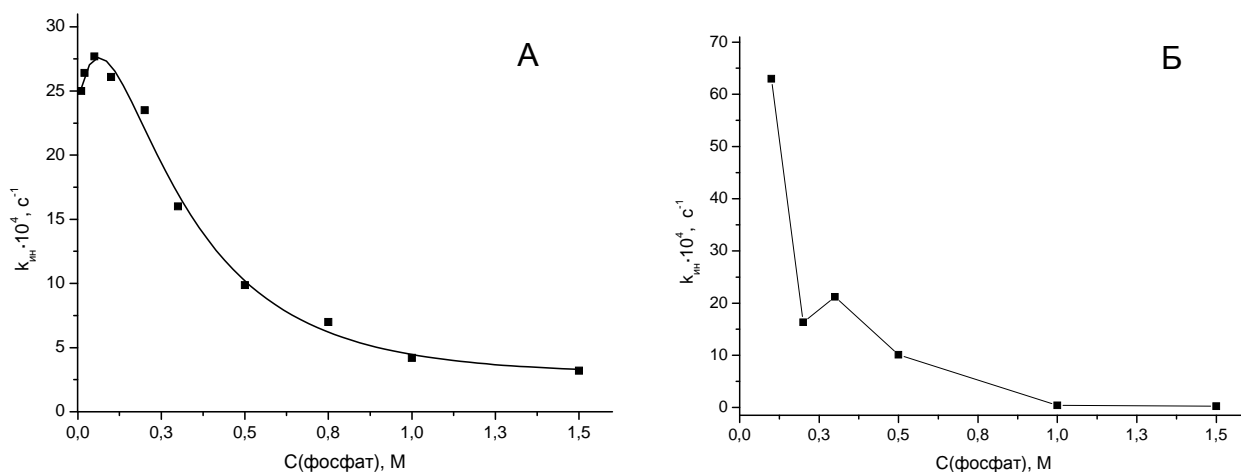


Рис. 4. Зависимости величины константы скорости инактивации $S_{\text{ФДГ}}$ от концентрации фосфат-иона. А - 0,01 М - 1,5 М натрий-фосфатный буфер, рН 7,0, 61°C и Б - 0,1 - 1,5 М натрий-фосфатный буфер, рН 8,0, 59°C.

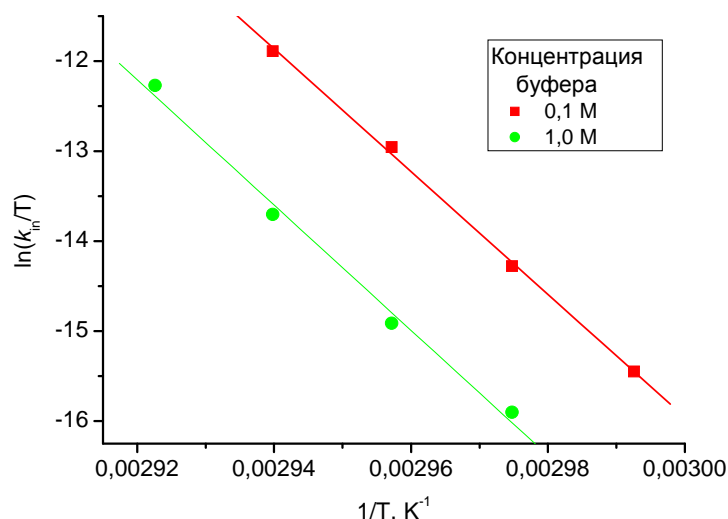


Рис. 5. Зависимости констант скорости инактивации PseФДГ GAV от температуры в координатах $\ln(k_{\text{ин}}/T) - 1/T, K^{-1}$ при концентрациях фосфатного буфера 0,1 и 1,0 М.

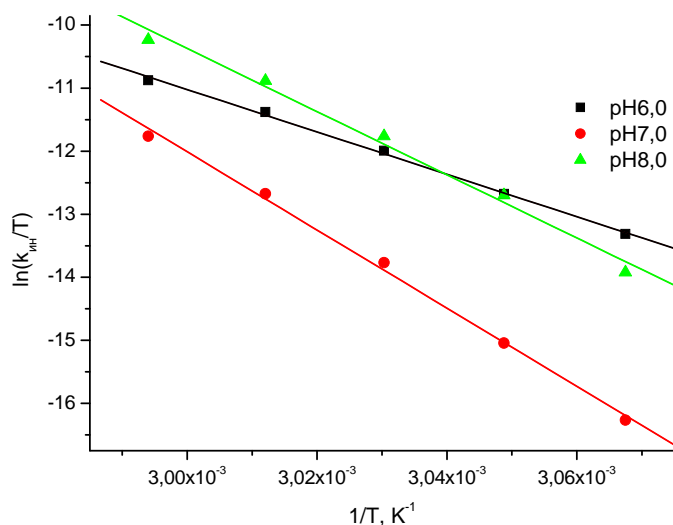


Рис. 6. Зависимости констант скорости инактивации $S_{\text{ФДГ}}$ от температуры в координатах $\ln(k_{\text{ин}}/T) - 1/T$, при различных значениях рН. 0,1М Na-фосфатный буфер.

Из рис. 5 хорошо видно, что в случае PseФДГ GAV наблюдается одинаковый наклон прямых, что свидетельствует об одинаковом изменении константы скорости инактивации от температуры как при низкой, так и при высокой концентрации буфера, так и при рН 8,0 (рис. 5) и рН 7,0 (на рис. не показано).

В случае $S_{\text{ФДГ}}$ картина намного сложнее. Фермент наиболее стабилен при рН 7,0. При рН 6,0 и 8,0 стабильность более низкая, но из-за разного наклона прямых при температурах выше 56°C $S_{\text{ФДГ}}$ более стабильна при рН 8,0, чем при рН 6,0 и прямо противоположная ситуация наблюдается при температурах ниже 56°C.

Из тангенсов угла наклона и величин отсекаемых отрезков были рассчитаны значения активационных параметров ΔH^\ddagger и ΔS^\ddagger (табл. 1). Порядок величин ΔH^\ddagger и ΔS^\ddagger свидетельствует, что термоинактивация ферментов обусловлена денатурацией белковой глобулы. Из таблицы 1 также хорошо видно, что во всех случаях для PseФДГ GAV наблюдаются гораздо большие значения ΔH^\ddagger активации, чем в случае $S_{\text{ФДГ}}$. Это означает, что с понижением температуры константа скорости

инактивации PseФДГ GAV уменьшается быстрее, чем в случае CboФДГ и, чем меньше температура, тем больше будет разница в стабильности.

Таблица 1

Значения активационных параметров для процесса термоинактивации для PseФДГ GAV и CboФДГ при различных pH и концентрациях буфера.

Условия	ΔH^\ddagger , кДж/моль	ΔS^\ddagger , Дж/(К·моль)
PseФДГ GAV, pH8,0, 1 М буфер	579±35	1390±100
PseФДГ GAV, pH8,0, 0,1 М буфер	569±15	1370±44
PseФДГ GAV, pH7,0, 0,1 М буфер	579±27	1380±67
wt-CboФДГ, pH6,0, 0,1 М буфер	280±9	500±30
wt-CboФДГ, pH7,0, 0,1 М буфер	500±30	1360±90
wt-CboФДГ, pH8,0, 0,1 М буфер	420±30	1240±80

По-видимому, именно этим и объясняется огромная разница в стабильности ферментов при пониженных температурах. PseФДГ GAV при +4°C в 0,1 М фосфатном буфере может храниться в течение года и более без потери активности, в то время как для CboФДГ при длительном хранении используют 40% глицерин и -20°C.

Таким образом, нами было впервые проведено сравнительное исследование

температурной стабильности двух формиаатдегидрогеназ, используемых на практике. Полученные данные однозначно свидетельствуют, что PseФДГ GAV намного превосходит по термостабильности CboФДГ. Более того, за счет практически одинаковой стабильности при разных pH (при одинаковой концентрации буфера) и характера изменения константы скорости инактивации от температуры PseФДГ GAV обеспечивает гораздо большую простоту и удобство для расчета стабильности биокатализатора при различных условиях проведения процесса.

Детекция наногаммовых количеств ФДГ на мембранах

Характеристика ферментов и биокатализаторов, созданных на их основе, невозможна без соответствующей методики детекции активности. В настоящее время разработано большое количество методов определения белков, но для многих из них присущ один серьезный недостаток - эти методики позволяют детектировать фермент в условиях отсутствия примесей (как других ферментов, так и низкомолекулярных соединений). Поэтому для применения таких методик используется дополнительная процедура пробоподготовки, что существенно увеличивает время анализа и удорожает процесс. Одним из простых и эффективных способов решений может быть сорбция фермента на мембрану, затем следует промывка мембраны для удаления примесей с последующей детекцией фермента непосредственно на мембране. Такая процедура также позволяет проводить концентрирование фермента за счет нанесения образца на мембрану несколько раз. В случае ФДГ есть много ситуаций, когда этот фермент надо определять в очень сложных смесях (культуральные и физиологические жидкости, образцы реакционной среды различных процессов). В литературе описана система детекции активности дегидрогеназ с помощью тетранитротетразолия синего (ТНТ), который через медиатор восстанавливается продуктом дегидрогеназной реакции NADH с образованием окрашенного нерастворимого продукта, однако, для ФДГ такая методика не была оптимизирована. Поэтому мы провели оптимизацию процесса по всем параметрам и добились чувствительности определения ФДГ в количестве до 15 нг в образце.

Фактически при таком способе детекции необходимо проведение трех реакций:

1. Собственно формиаатдегидрогеназная реакция, в результате которой образуется NADH.

2. Далее NADH неферментативно окисляется медиатором, в качестве которого могут выступать феназинметасульфат (ФМС) и его производные.

3. Восстановленный ФМС или его производные затем восстанавливают ТНТ в нерастворимый окрашенный продукт нерегулярного строения.

На первом этапе мы изучили зависимость активности ФДГ от концентрации фермента и показали, что такая зависимость линейна во всем изученном диапазоне концентраций, т. е. в этом диапазоне не происходило изменения агрегационного состояния фермента. Потом были исследованы спектральные характеристики реакционной системы до и после проведения реакции. Было показано, что продукт восстановления ТНТ имеет широкий максимум поглощения в районе 560-620 нм. Затем были протестированы два медиатора - ФМС и его метильное производное - 5-метил-ФМС. Было показано, что 5-метил-ФМС является более эффективным медиатором, чем ФМС, поскольку время, за которое достигается одинаковая величина поглощения $A_{600} 0,5$ в случае 5-метил-ФМС было в 1,5 раза меньше, чем в случае ФМС. Третьим этапом была оптимизация концентрации ТНТ. Оказалось, что при концентрации ТНТ больше 0,075 мг/мл скорость образования продукта практически одинакова, поэтому для проведения концентрации нами была выбрана концентрация 0,1 мг/мл.

На заключительном этапе было проверено 2 типа мембран, которые нашли наиболее широкое применение в молекулярной биологии, - на основе нитроцеллюлозы (от 3 производителей) и поливинилидендифторида. Оказалось, что нитроцеллюлозная мембрана фирмы BioRad дает высокую чувствительность при наименьшем фоне. На эту мембрану были нанесены образцы ФДГ с различной концентрацией. После проведения реакции была проведена количественная оценка интенсивности пятен с помощью программы ScanArray Express фирмы Perkin Elmer. Калибровочный график представлен на рис. 7. Как видно из этого рисунка, наблюдается линейная зависимость интенсивности окраски пятна от количества ФДГ в пробе в диапазоне 15-160 нг.

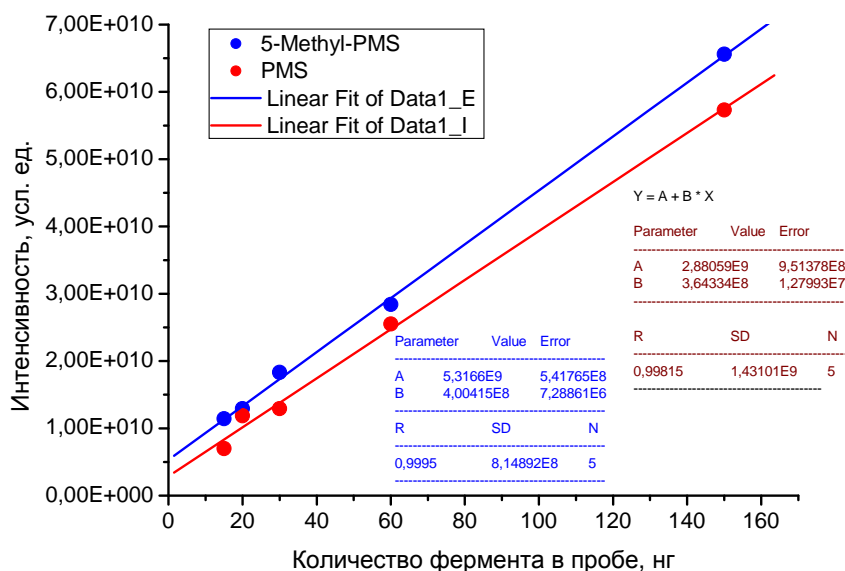


Рис. 7. Зависимость интенсивности окраски пятна от количества форматдегидрогеназы в пробе.

Таким образом, в результате оптимизации нами была разработана методика, позволяющая детектировать ФДГ в количестве до 15 нг в образце, что примерно в 100 раз меньше, чем в случае детекции фермента по окраске с красителями Кумасси. Данная методика в первую очередь может быть использована для скрининга библиотек клонов с мутантными ФДГ по активности.

Белковая инженерия формиатдегидрогеназы из сои

Как уже отмечалось выше, для создания на основе SoyФДГ биокатализатора регенерации NADH, эффективного при низких концентрациях субстрата, у данного фермента было необходимо повысить каталитическую константу и термостабильность. Для этого нами был использован подход, известный как "рациональный дизайн". Он основан на тщательном анализе структуры фермента, на основании которого выбираются наиболее перспективные замены. Дополнительно проводится моделирование мутантных ферментов для оценки возможных изменений структуры и вытекающих из этого изменений свойств. После завершения моделирования с помощью полимеразной цепной реакции в ген фермента вводили нуклеотидные замены, обеспечивающие необходимую аминокислотную замену. Плазмиды с генами мутантных ферментов секвенировали по двум цепям для подтверждения наличия в генах только требуемых мутаций. Плазмиды трансформировали в штамм *E. coli* BL21(DE3) CodonPlus/pLysS. Затем проводили культивирование штаммов-продуцентов и из полученной биомассы выделяли целевые ферменты. Согласно данным аналитического электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия чистота полученных препаратов мутантных SoyФДГ составляла не менее 95%.

На рис. 7 представлена структура тройного комплекса SoyФДГ с коферментом NAD⁺ и азид-ионом, который является конкурентным по формиату ингибитором фермента (окрашены темно-синим и розовым цветом соответственно). Анализ этой структуры показал, что в районе кофермент-связывающего домена активного центра на поверхности белковой глобулы находится гидрофобный остаток Phe290 (на рис. показан красным цветом). С точки зрения термодинамики наличие гидрофобного остатка на поверхности белковой глобулы очень не выгодно. Поэтому было решено произвести замену этого остатка на другие аминокислотные остатки.

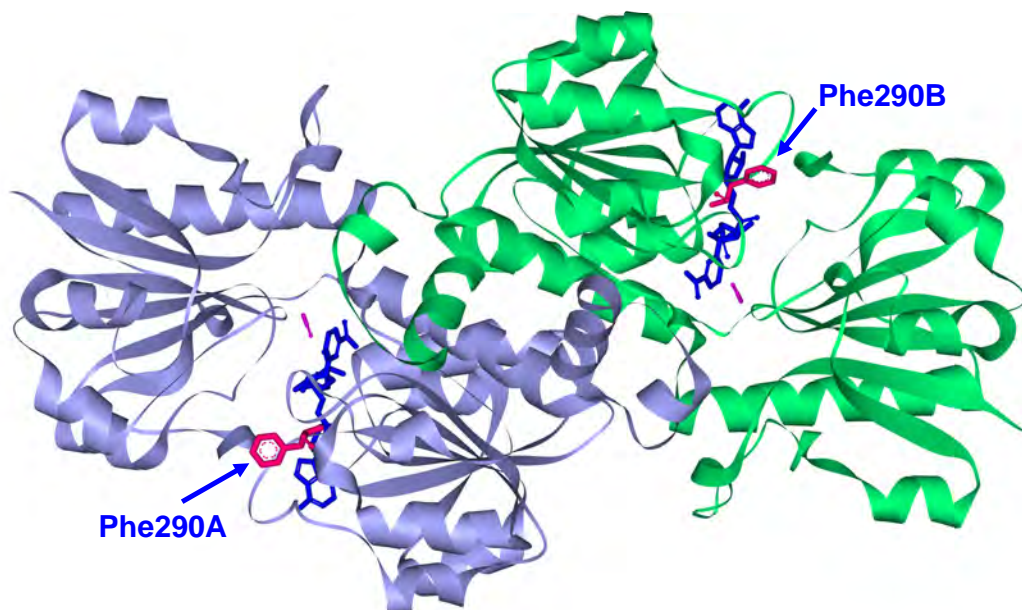


Рис. 8. Структура тройного комплекса [SoyФДГ-NAD⁺-N₃⁻], разрешение 1,9 Å.

Выравнивание аминокислотных последовательностей ФДГ из разных растений показало, что в положении 290 кроме остатка Phe могут находиться остатки Tyr, Asp, Asn и Ser. Поэтому мы решили заменить остаток Phe290 на эти 4 остатка и дополнительно сделать еще 4 замены на остатки Ala, Glu, Gln и Thr. Для того, чтобы оценить возможное влияние наших замен, мы провели компьютерное моделирование структур этих мутантов. Для двух мутантов результаты моделирования представлены на рис. 9. Оказалось, что введение

новых аминокислотных остатков (кроме остатка Ala) может приводить к образованию дополнительных водородных связей (рис. 9Б). Очевидно, что в случае замены на остаток Ala новые водородные связи возникнуть не могут (рис. 9А). В остальных случаях образуется от двух до четырех новых водородных связей. Особо следует отметить, что во всех случаях (кроме замены на остаток Ala), всегда образуется водородная связь с остатком Gln292. Этот остаток находится в активном центре и контактирует с каталитически важным остатком His311. Таким образом, данные моделирования позволяют полагать, что у новых мутантных СоуФДГ с высокой долей вероятности будут изменяться каталитические свойства.

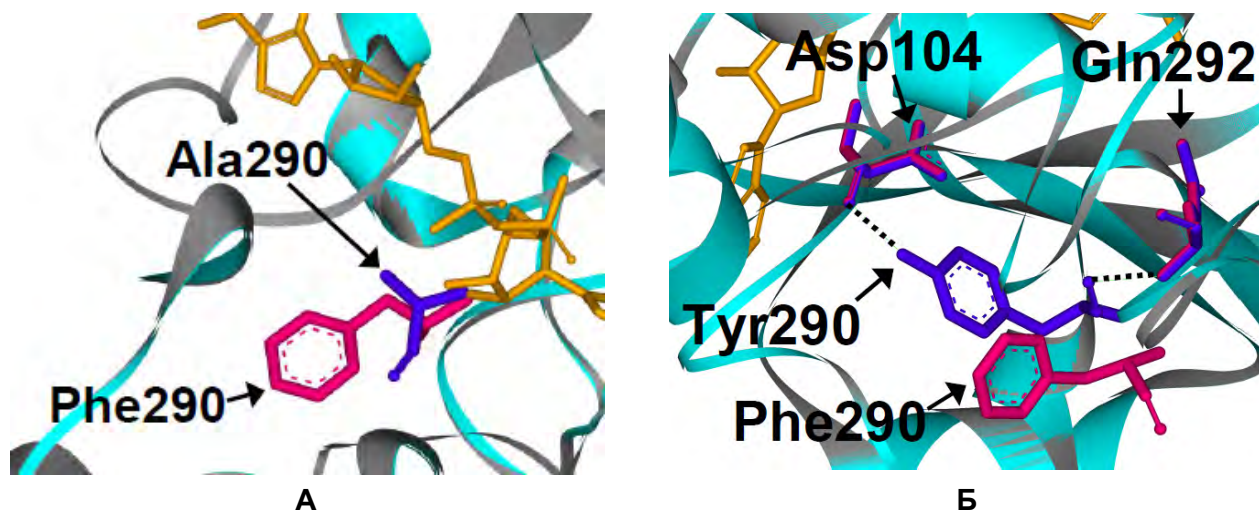


Рис. 9. Моделирование структур мутантных СоуФДГ с заменами Phe290Ala и Phe290Tyr.

Кроме того, при анализе структуры фермента наше внимание привлекли остатки Val127 и Ala267. В первом случае за счет введения остатка Arg могла появиться ионная пара с остатком Glu169 из соседней субъединицы. Остаток Ala267 расположен рядом с полостью внутри белковой глобулы, в которой находится молекула воды. Замена Ala267Met позволяет заполнить эту внутреннюю полость и удалить из нее термодинамически невыгодную молекулу воды.

Таким образом, в результате компьютерного анализа и моделирования было предложено сделать 10 аминокислотных замен. Все полученные мутанты экспрессировались в виде активных ферментов и после выделения в высокоочищенном виде были изучены их каталитические свойства и термостабильность.

Кинетические свойства полученных мутантных СоуФДГ

Значения констант Михаэлиса определяли из зависимостей скорости реакции от концентрации одного субстрата (диапазон концентраций составлял $0,3K_M$ - $6K_M$) и фиксированной, насыщающей ($>20K_M$) концентрации второго субстрата. Концентрацию активных центров фермента определяли с помощью разработанной в нашей лаборатории методики по тушению собственной флуоресценции фермента (Романова Е. и соавт. Вестник МГУ, Серия 2: Химия, 2010, **51**, 156-159) В таблице 2 приведены каталитические параметры для всех полученных мутантных ферментов и исходной СоуФДГ. Для сравнения также приведены соответствующие параметры ряда других ФДГ из растений, дрожжей и бактерий, которые являются лучшими для каждого из источников.

Как видно из таблицы 2, в 9 случаях из 10 в результате введения точечных замен увеличилась каталитическая константа k_{cat} и это увеличение составило от 20% до 75%. В результате у ряда мутантов величина k_{cat} стала существенно выше, чем у другой растительной ФДГ из *A. thaliana* и главного нашего конкурента - ФДГ из дрожжей *S. boidinii*.

Однако, следует признать, что величина каталитической константы у полученных мутантных SoyФДГ все еще меньше, чем у бактериальных ферментов.

Таблица 2

Сравнение кинетических параметров мутантных ФДГ и фермента дикого типа с другими формиатдегидрогеназами (0,1 М Na-фосфатный буфер, pH 7,0, 30°C).

Фермент	k_{cat} , с ⁻¹	$K_M^{NAD^+}$, мкМ	$K_M^{HCOO^-}$, мМ	$k_{cat}/K_M^{NAD^+}$, (мкМ*с) ⁻¹	$k_{cat}/K_M^{HCOO^-}$, (мМ*с) ⁻¹
wt-AraФДГ, <i>A. thaliana</i>	3,8	50	2,8	0,08	1,36
wt-SoyФДГ, <i>G.max</i>	2,9±0,1	13,3±0,8	1,5±0,1	0,20	1,93
SoyФДГ F290A	3,8±0,1	8,6±0,6	1,1±0,1	0,44	3,45
SoyФДГ F290Y	3,5±0,1	10,9±0,3	0,9±0,1	0,32	3,89
SoyФДГ F290Q	3,5±0,2	11,7±0,6	1,2±0,1	0,29	2,92
SoyФДГ F290E	4,7±0,4	13,7±0,7	2,9±0,1	0,34	1,62
SoyФДГ F290T	4,0±0,4	14,3±0,9	1,3±0,1	0,28	3,08
SoyФДГ F290N	2,8±0,1	14,0±1,0	4,5±0,3	0,20	0,62
SoyФДГ F290D	5,1±0,3	12,8±0,8	5,0±0,2	0,40	1,02
SoyФДГ F290S	4,1±0,2	9,1±0,7	4,1±0,3	0,45	1,00
SoyФДГ V127R	3,6±0,7	9,5±0,5	3,4±0,2	0,38	1,06
SoyФДГ A267M	5,0±0,9	9,9±0,8	2,1±0,2	0,51	2,38
wt-MorФДГ, <i>Moraxella</i> sp. C-1,	7,3	80	7,5	0,09	0,97
wt-PseФДГ, <i>Pseudomonas</i> sp.101	7,3	65	6,5	0,11	1,12
PseФДГ GAV	7,3	35	6,0	0,21	1,22
wt-CboФДГ, <i>C. boidinii</i>	3,7	45	5,9	0,08	0,63

Вторым важным результатом является то, что замены Phe290 на остатки Gln, Glu, Thr, Asn, Asp практически не влияют на константу Михаэлиса по NAD⁺, а в случае замены Phe290 на остатки Ala, Tyr, Ser и замен Val127Arg и Ala290Met она даже улучшается. В случае K_M по формиату у половины мутантов она возросла, но незначительно, не более, чем в три раза, у трех мутантов не изменилась, а у двух мутантов - Phe290Ala и Phe290Tyr, даже улучшилась. Увеличение каталитической константы при неизменных или улучшенных значениях K_M привело к тому, что у ряда полученных мутантных SoyФДГ каталитическая эффективность по коферменту возросла в 2 – 2,5 раза по сравнению не только с SoyФДГ дикого типа, но и наилучшего до этого момента мутантного фермента из бактерии PseФДГ GAV (табл. 2). В случае K_M по формиату превосходство отдельных мутантных SoyФДГ составило 2,5-3,4 раза. Таким образом, мы получили мутантные SoyФДГ с самой высокой каталитической эффективностью среди всех известных ФДГ.

Температурная стабильность полученных мутантных SoyФДГ

В зависимости от стабильности кинетику инактивации SoyФДГ дикого типа и полученных мутантных ферментов изучали в диапазоне температур от 46 до 64°C. На рис. 10 представлены зависимости остаточной активности от времени для 9 мутантных SoyФДГ и фермента дикого типа (wt-SoyФДГ). Данные для мутантной SoyФДГ Val127Arg не показаны, так ее стабильность оказалась ниже таковой для wt-SoyФДГ в 2,5-5 раз, в то время

как все остальные мутанты при 56°C (единственная температура, при которой можно было измерить кинетику инактивации для всех ферментов) превосходили исходный фермент от 1,3 до 60 раз. Как видно из рис. 10, самый высокий эффект стабилизации наблюдался при замене остатка Phe290 на остатки глутаминовой и аспарагиновой кислот.

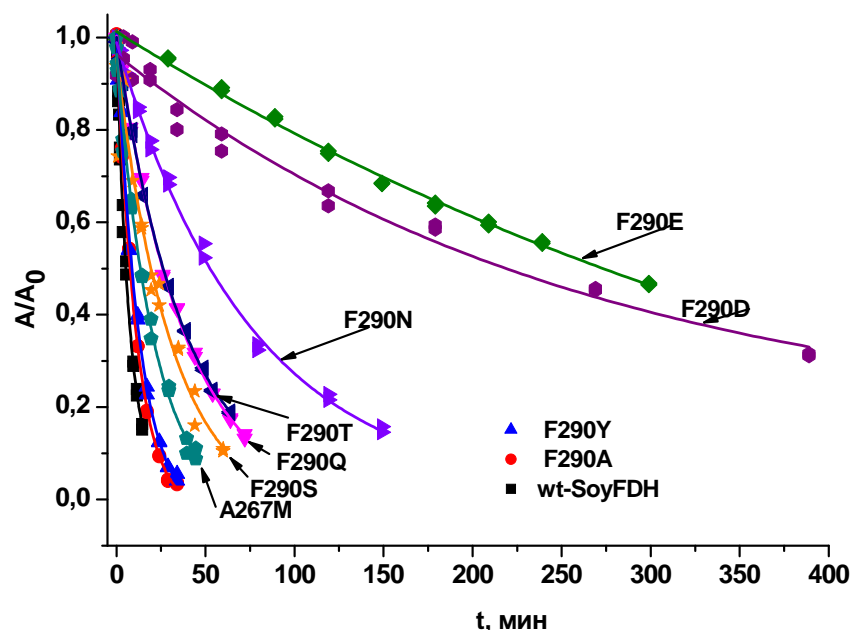


Рис. 10. Зависимости констант остаточной активности мутантных SoyФДГ и фермента дикого типа от времени. 0,1 М Na-фосфатный буфер, pH 7,0, 56°C.

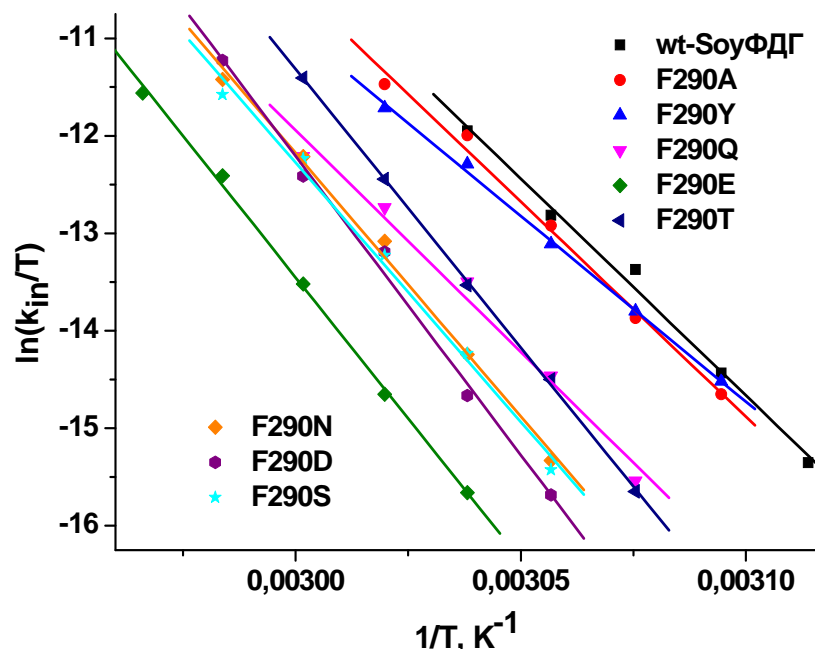


Рис. 11. Зависимости констант скорости термоинактивации мутантных SoyФДГ и фермента дикого типа от температуры. 0,1 М Na-фосфатный буфер, pH 7,0.

в таблице 3 представлены величины стабилизационных эффектов для полученных мутантных SoyФДГ. Как видно из этой таблицы, в случае замены Phe290Ala разница в стабильности с wt-SoyФДГ постоянная. В случае трех замен при снижении температуры эффект стабилизации падает, а в случае 7 замен – увеличивается.

Для всех изученных мутантов соблюдался мономолекулярный механизм инактивации. Поэтому полученные зависимости были представлены в координатах $\ln(k_{in}/T)$ от $1/T$, которые используют для линеаризации уравнения зависимости константы скорости от температуры в теории активированного комплекса (рис. 11). Как видно из рисунка 11, во всех случаях эти зависимости представляют собой прямые, которые имеют разный наклон. Из тангенса угла наклона и величины отсекаемого отрезка были получены значения ΔH^\ddagger и ΔS^\ddagger , которые позволили рассчитать значения констант скоростей инактивации при тех температурах, которые выходят за экспериментальный диапазон.

Разный наклон прямых на рис. 11 для мутантов и SoyФДГ дикого типа означает разный характер изменения величины константы скорости от температуры. Если угол наклона больше, то при снижении температуры константа скорости инактивации у мутанта будет уменьшаться быстрее и отношение констант k_{in}^{wt}/k_{in}^{mut} (т.е. стабилизационный эффект) будет увеличиваться и наоборот.

Таблица 3.

Значения эффекта стабилизации* мутантных SoyФДГ по отношению к ферменту дикого типа при различных температурах(0,1 М Na- фосфатный буфер, рН 7,0).

Т, °С	Замены									
	F290A	V127R	F290Y	F290Q	A267M	F290S	F290T	F290N	F290E	F290D
25	1,18	0,03	0,21	1,78	8,55	51,7	212	204	3030	10890
30	1,20	0,10	0,30	2,17	6,88	33,2	109	121	1440	4140
48	1,26	0,30	0,98	4,14	4,03	8,83	11,9	20,9	119	164
50	1,27	0,35	1,11	4,43	3,79	6,45	9,47	17,5	91,5	120
52	1,28	0,41	1,25	4,74	3,57	5,54	7,54	14,6	70,7	84,1
54	1,29	0,42	1,41	5,06	3,37	4,76	6,02	12,2	54,9	60,6
56	1,29	0,51	1,59	5,40	3,18	4,10	4,82	10,2	42,7	43,8
58	1,30	0,62	1,78	5,76	3,00	3,54	3,87	8,61	33,4	31,8
60	1,31	0,73	2,00	6,14	2,83	3,06	3,11	7,25	26,1	23,2
62	1,31	0,85	2,25	6,53	2,68	2,65	2,51	6,12	20,5	16,9
64	1,32	0,99	2,51	6,95	2,53	2,30	2,03	5,18	16,1	12,4

* эффект стабилизации рассчитывался как отношение констант скорости инактивации для SoyФДГ дикого типа и мутанта при одной температуре. Серым, красным и синим фоном выделены случаи, когда эффект стабилизации соответственно не зависит, уменьшается и увеличивается при снижении температуры.

Таким образом, с помощью рационального дизайна нами получены мутантные SoyФДГ, которые по каталитической эффективности с NAD⁺ и формиаом соответственно в 2 – 2,5 и 2,1 – 3,5 раза выше по сравнению с известными ФДГ. Кроме того, была существенно повышена их термостабильность. С точки зрения применения на практике наиболее перспективными являются 4 мутантные SoyФДГ с заменами остатка Phe290 на остатки Asp, Glu, Ser и заменой Ala267Met. Кроме того, в будущем можно попытаться улучшить свойств мутантных SoyФДГ за счет объединения лучших точечных замен.

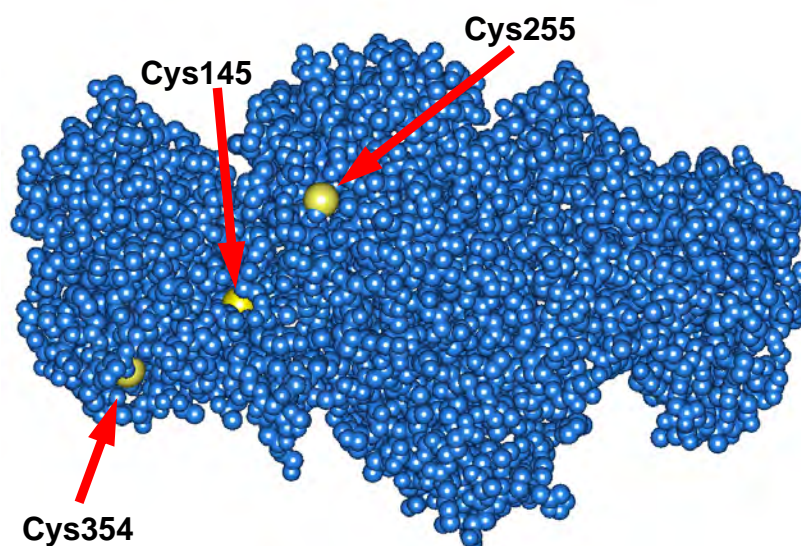


Рис. 12. Остатки Cys на поверхности глобулы PseФДГ (структура 2NAC).

Повышение операционной (химической) стабильности PseФДГ

Анализ структуры PseФДГ показывает, что на поверхности белковой глобулы находятся три остатка цистеина, доступные действию растворителя (рис. 12). Мутагенез по 255-му положению был проведен ранее и было показано, что лучшей является замена на остаток Ala. В данной работе были получены мутантные PseФДГ с заменами остатков Cys145 и Cys354 на остатки Ala и Ser. Кроме того, на основе результатов сравнения аминокислотных последовательностей ФДГ было решено сделать замену Cys345Arg. Далее по результатам исследования свойств этих мутантов для каждого положения были отобраны лучшие замены и, взяв за основу PseФДГ GAV, были получены два мутанта с двойными заменами по остаткам Cys – C145S/C255A и C255A/C354S. Все мутанты экспрессировались в активной форме и были получены в виде высокоочищенных препаратов.

Кинетические свойства мутантных по остаткам цистеина PseФДГ

В таблице 4 представлены каталитические параметры мутантных PseФДГ с заменами остатков Cys, а также для сравнения представлены данные для других ФДГ.

Таблица 4

Сравнение кинетических параметров мутантных по остаткам Cys PseФДГ и фермента дикого типа с другими формиаатдегидрогеназами (0,1 М Na-фосфатный буфер, pH 7,0, 30°C).

Фермент	k_{cat} , с ⁻¹	$K_M^{NAD^+}$, мкМ	$K_M^{HCOO^-}$, мМ	$k_{cat}/K_M^{NAD^+}$, (мкМ*с) ⁻¹	$k_{cat}/K_M^{HCOO^-}$, (мМ*с) ⁻¹
wt-AraФДГ	3,8	50	2,8	0,08	1,36
wt-SoyФДГ	2,9±0,1	13,3±0,8	1,5±0,1	0,20	1,93
SoyФДГ F290A	3,8±0,1	8,6±0,6	1,1±0,1	0,44	3,45
SoyФДГ A267M	5,0±0,9	9,9±0,8	2,1±0,2	0,51	2,38
SoyФДГ F290D	5,1±0,3	12,8±0,8	5,0±0,2	0,40	1,02
wt-MorФДГ	7,3	80	7,5	0,09	0,97
wt-PseФДГ	7,3	65	6,5	0,11	1,12
PseФДГ C354A	7,3	65±4	8,7±0,8	0,11	0,84
PseФДГ C354S	7,3	60±7	7,0±0,8	0,12	1,06
PseФДГ C354R	7,3	57±4	7,4±0,9	0,13	0,99
PseФДГ C145A	7,3	57±6	6,2±0,2	0,13	1,18
PseФДГ C145S	7,3	47±4	7,2±0,2	0,15	1,01
PseФДГ GAV (C255A)	7,3	35	6,0	0,21	1,22
PseФДГ GAV C354S	7,3	60±3	6,9±0,8	0,12	1,06
PseФДГ GAV C145S	7,3	41±4	3,2±0,2	0,18	2,28
wt-CboФДГ	3,7	45	5,9	0,08	0,63

Как видно из таблицы. 4, при замене остатка Cys354 на остатки Ala, Ser и Arg кинетические параметры мутантов сравнимы с таковыми для wt-PseФДГ. В случае замен в 145 положении каталитические свойства также меняются слабо. Введение замены Cys354Ser в мутантную PseФДГ GAV приводит к получению мутанта аналогичного по каталитическим свойствам PseФДГ дикого типа. В случае двойной замены Cys145Ser/Cys255Ala в мутантной PseФДГ GASV наблюдается двукратное улучшение K_M по формиату при небольшом увеличении K_M по NAD⁺.

Термостабильность мутантных по остаткам цистеина PseФДГ

На рис. 13 представлены данные по кинетике термоинактивации мутантных PseФДГ с заменами Cys354Ala, Cys354Ser и Cys354Arg. Как видно из этого рисунка, все замены

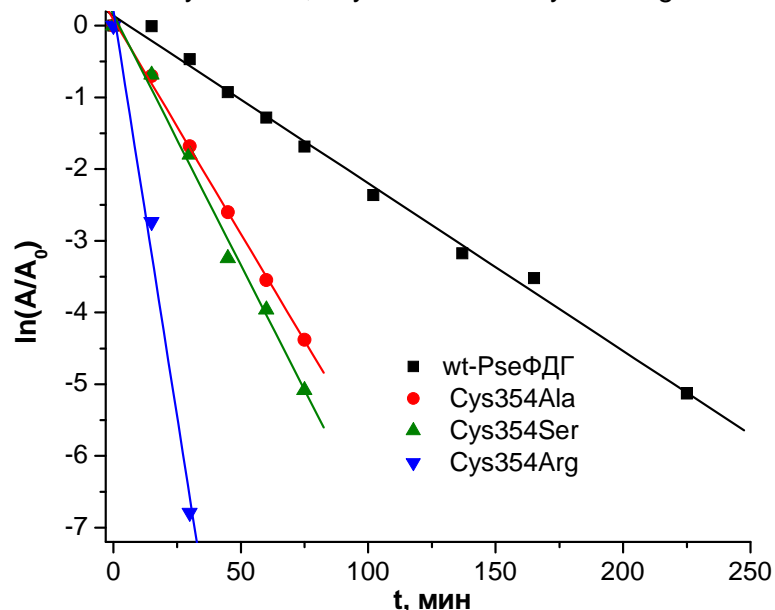


Рис. 13. Термоинактивация wt-PseФДГ и ее мутантов с заменами Cys354Ala, Cys354Ser, Cys354Arg. 0,1 М Na- фосфатный буфер, pH 7,0, 62°C.

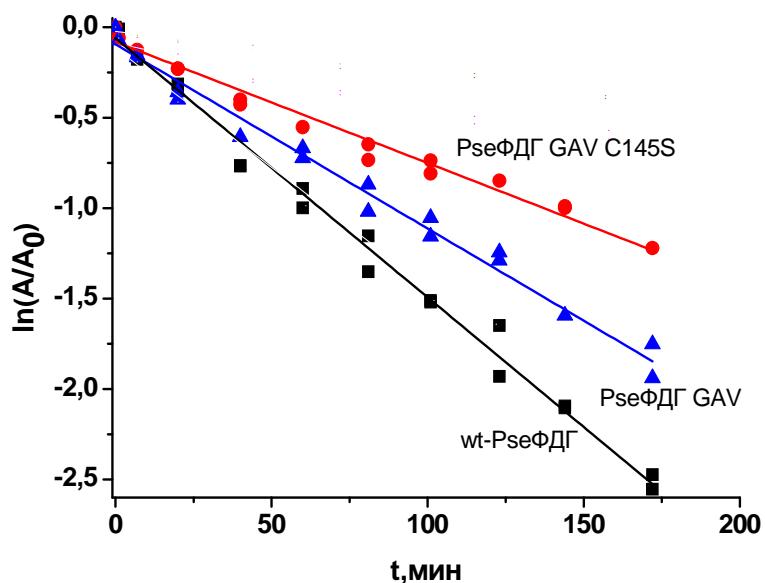


Рис. 14. Термоинактивация wt-PseФДГ и мутантов PseФДГ GAV и PseФДГ GAV Cys145Ser (PseФДГ GASV). 0,1 М Na-фосфатный буфер, pH 7,0, 64°C.

вызывают очень сильную дестабилизацию фермента (особенно при замене Cys354Arg). Поскольку термостабильности PseФДГ с заменами Cys354Ala и Cys354Ser близки, а второй мутант имеет более высокие каталитические параметры, то именно последняя замена и была введена в PseФДГ GAV для изучения роли остатка Cys354 в химической стабильности фермента. Полученный мутант PseФДГ GAV Cys354Ser по стабильности был немного хуже, чем wt-PseФДГ (на рис. не показано).

Замена Cys145Ala не влияла на стабильность wt-PseФДГ, а замена Cys145Ser увеличивала таковую почти в два раза. Поэтому эта замена была сделана и в PseФДГ GAV. Эффект стабилизации оказался аддитивным (рис. 14) и в результате была получена PseФДГ GASV – одна из самых термостабильных ФДГ, описанных в литературе и одновременно обладающая самыми лучшими каталитическими параметрами среди известных ФДГ из бактерий и дрожжей.

Таким образом, в результате выполнения данной части работы были получены мутантные PseФДГ с двойными заменами по остаткам цистеина - C145S/C255A и C255A/C354S. Первый мутант PseФДГ GASV обладал улучшенными кинетическими свойствами и повышенной термостабильностью. В случае второго мутанта снижение термостабильности не является критическим и он также может быть использован на практике в случае увеличения его операционной (химической) стабильности по сравнению с исходным мутантом PseФДГ GAV. Поэтому следующим этапом было изучение химической стабильности полученных мутантов, а также других формиаатдегидрогеназ.

Разработка метода оценки химической стабильности ФДГ

Остатки Cys являются одними из наиболее реакционноспособных и, как правило, их модификация или окисление приводят к потере активности ферментов. Ранее при модификации остатков Cys в ФДГ применяли ионы меди Cu^{2+} и специфические реагенты на сульфгидрильные группы остатков цистеина, такие как 5,5'-дитио-бис(2-нитробензоат) (ДТНБ) и *l*-хлормеркурибензоат (ПХМБ). Недостатком таких реагентов является их достаточно большой размер. Поэтому нами было решено использовать другой реагент – пероксид водорода. Это было сделано по следующим причинам:

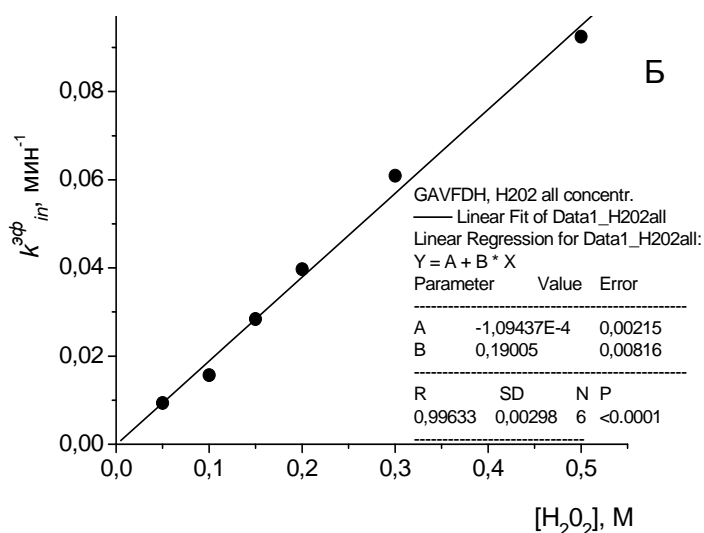
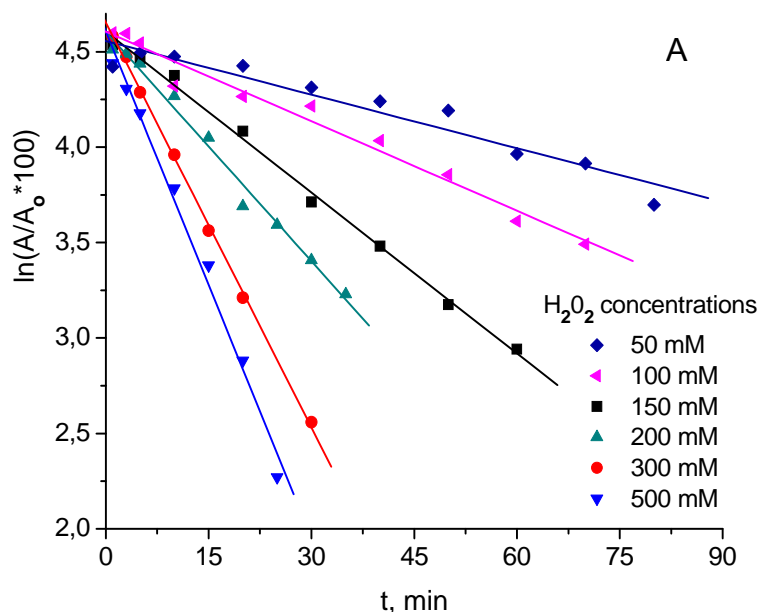
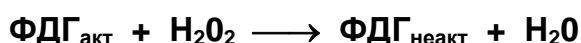


Рис. 15. Кинетика инактивации PseФДГ GAV (А) и зависимость наблюдаемой константы скорости инактивации фермента (Б) от концентрации пероксида водорода. 0,1 М Na-фосфатный буфер, pH 7,0, 25°C.

только *in vitro*, но и *in vivo*.

На примере PseФДГ GAV была исследована кинетика инактивации при различных концентрациях пероксида водорода. Зависимости остаточной активности фермента от времени при всех изученных концентрациях пероксида водорода описываются простой экспонентой (рис. 15А). Из тангенса угла наклона прямой можно рассчитать эффективную константу скорости инактивации $k_{in}^{2\phi}$. Величина этой константы не зависела от концентрации фермента. Зависимость эффективной константы скорости инактивации от концентрации H_2O_2 представляет собой прямую (рис. 15Б). Это означает, что взаимодействие фермента с пероксидом водорода происходит по би-молекулярному механизму:



1) Пероксид водорода имеет небольшие размеры и способен окислять сульфгидрильные группы не только на поверхности, но и в глубине белковой глобулы, чего не могут ПХМБ и ДТНБ, которые имеют достаточно большие размеры.

2) Пероксид водорода активно образуется в живой клетке, т.е. он является природным инактивирующим агентом. Высокие концентрации пероксида водорода в клетке возникают при стрессовых воздействиях. В силу природного происхождения и малого размера молекулы пероксид водорода является хорошим химическим агентом для оценки стабильности ФДГ не

Таким образом, если инактивацию формиатдегидрогеназ из разных источников (или различных мутантных форм) изучать при одной и той же постоянной концентрации пероксида водорода, то величина эффективной константы скорости инактивации первого порядка $k^{эф}_{in}$ может быть использована в качестве количественной характеристики стабильности данной ФДГ. В дальнейшем для проведения экспериментов была выбрана концентрация пероксида водорода 0,15 М.

Химическая стабильность мутантных PseФДГ и фермента дикого типа

На рис. 16 представлены результаты изучения кинетики инактивации пероксидом водорода PseФДГ дикого типа и трех мутантных ферментов, в которых были заменены различные остатки цистеина.

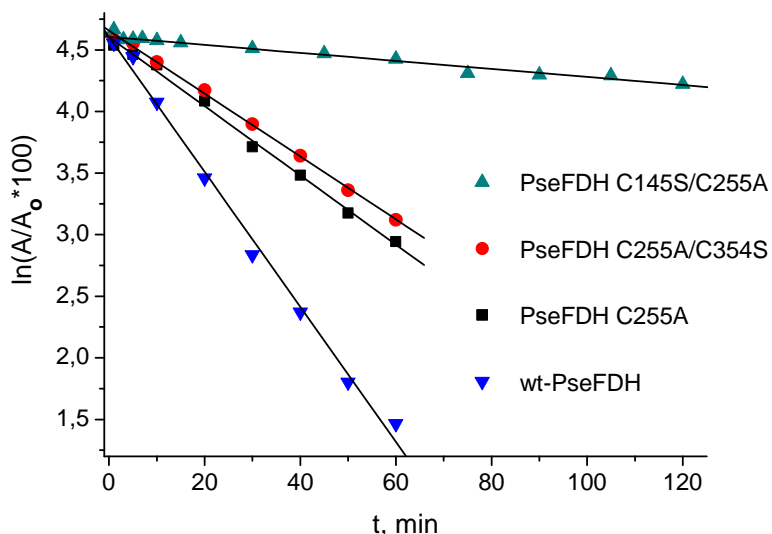


Рис. 16. Инактивация пероксидом водорода PseФДГ дикого типа (wt-PseFDH) и ее мутантов с различными заменами остатков Cys. 0,15 М H₂O₂, 0,1 М Na-фосфатный буфер, pH 7,0, 25°C.

химической стабильности PseФДГ. Наиболее высокая стабильность против инактивации пероксидом водорода наблюдается в случае замены двух остатков цистеина, расположенных в активном центре фермента – Cys145Ser и Cys255Ala.

Сравнение величин эффективных констант скоростей инактивации $k^{эф}_{in}$ для PseФДГ дикого типа и ее мутантов PseФДГ GV Cys255Ala (PseФДГ GAV) и PseФДГ GV C145S/C255A (PseФДГ GASV) свидетельствует, что вклад остатков Cys145 и Cys255 в величину $k^{эф}_{in}$ составляет $4,17 \cdot 10^{-5}$ и $4,40 \cdot 10^{-5}$ с⁻¹ соответственно, т.е. оба остатка практически одинаково взаимодействуют с пероксидом водорода, несмотря на то, что в случае использования в качестве модифицирующего агента ДТНБ разница в реакционной способности между остатками Cys145 и Cys255 составляет минимум 2-3 порядка.

Сравнение химической стабильности ФДГ бактерий и растений

На последнем этапе мы изучили устойчивость против инактивации пероксидом водорода ФДГ из разных источников. Для исследования были взяты 3 формиатдегидрогеназы, чей биосинтез резко возрастает в условиях стресса - бактериальная из *Staphylococcus aureus* – SauФДГ и две растительные АгаФДГ и СоуФДГ (рис. 17). В качестве сравнения использовали PseФДГ дикого типа и ее наиболее химически устойчивый мутант PseФДГ GASV. PseФДГ не является белком стресса. Ее биосинтез индуцируется при росте бактерии *Pseudomonas* sp.101 на метаноле.

Как и следовало ожидать, самая низкая стабильность наблюдается в случае PseФДГ дикого типа (рис. 14, нижняя прямая). Замена Cys255Ala приводит к тому, что константа скорости инактивации снижается почти в два раза ($k^{эф}_{in}$ $9,13 \cdot 10^{-4}$ и $4,69 \cdot 10^{-4}$ с⁻¹ соответственно). В следующей мутантной форме в PseФДГ GAV в дополнение к замене Cys255Ala была введена мутация Cys354Ser. Как видно, введение такой замены очень слабо влияет на стабильность фермента против инактивации H₂O₂, что свидетельствует о том, что остаток Cys354 не является существенным для

Как видно из рис. 17, “стрессовые” ФДГ, как растительные, так и бактериальная, обладают высокой стабильностью против инактивации пероксидом водорода. Они намного

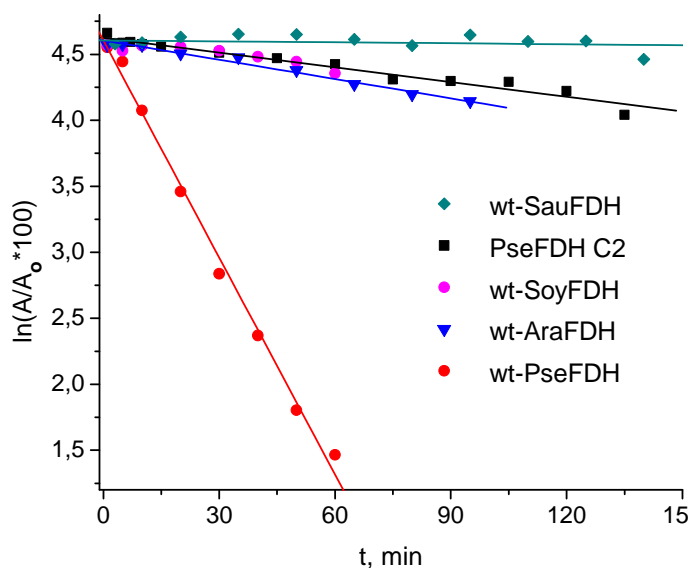


Рис. 17. Инактивация пероксидом водорода ФДГ из различных источников. wt-SauFDH, wt-PseFDH, wt-SoyFDH и wt-AraFDH - рекомбинантные ФДГ дикого типа из бактерий *S. aureus* и *Pseudomonas* sp.101, сои *G. max* и растений *A. thaliana* соответственно. PseFDH C2 – мутантная PseФДГ GASV с заменами C145S/C255A. 0,15 М пероксид водорода, 0,1 М Na-фосфатный буфер, pH 7,0, 25°C.

ферментов при стрессовых воздействиях на организм *in vivo*. В случае растений величина и длительность таких воздействий, при которых клетка погибает, намного меньше по сравнению с теми стрессовыми условиями, при которых могут существовать биопленки *S. aureus*. Очевидно, что более высокая сопротивляемость стафилококков к стрессу должна быть обеспечена высокой стабильностью всех компонентов клетки (в том числе и формиаатдегидрогеназы), отвечающих за выживание в стрессовых условиях.

ВЫВОДЫ

1. Проведено сравнительное исследование термостабильности формиаатдегидрогеназы дикого типа из дрожжей *Candida boidinii* CboФДГ и мутантного фермента PseФДГ GAV из бактерии *Pseudomonas* sp.101 при различных pH, концентрации буфера и температурах. Определены константы скорости инактивации и активационные параметры для процессов термоинактивации обоих ферментов. Показано, что PseФДГ GAV превосходит по стабильности CboФДГ во всем исследованном диапазоне pH и концентраций буфера.

2. Разработана высокочувствительная методика детекции наногаммовых количеств ФДГ на мембранах. Данная методика может быть использована для скрининга библиотек мутантных формиаатдегидрогеназ.

3. В результате анализа структуры ФДГ из сои *Glycine max* SoyФДГ предложено провести замены по положениям 127, 267 и 290. Проведено компьютерное моделирование возможных замен, отобраны наиболее перспективные варианты и получено 10 мутантных SoyФДГ. Показано, что введенные аминокислотные замены приводят к увеличению термостабильности и(или) улучшению кинетических параметров. Достигнуты величины каталитической эффективности, которые минимум в два раза превосходят таковые для других известных формиаатдегидрогеназ.

стабильнее, чем PseФДГ дикого типа, и только самый лучший мутант PseФДГ GASV может сравниться по стабильности с ФДГ растений. Также отметим, что растительные ФДГ, демонстрируя практически одинаковую стабильность против инактивации пероксидом водорода, отличаются по термостабильности более чем в 5000 раз. Самой высокой стабильностью при инактивации пероксидом водорода обладала ФДГ из патогенных бактерий *S. aureus*. SauФДГ также характеризуется высокой термостабильностью. По этому параметру среди известных формиаатдегидрогеназ она уступает только PseФДГ.

Более высокая стабильность SauФДГ при инактивации пероксидом водорода по сравнению с ФДГ растений очень хорошо согласуется с требованиями по стабильности этих

4. Проведен анализ структуры ФДГ из бактерии *Pseudomonas* sp.101 и получены мутантные PseФДГ с заменами Cys145Ala и Cys145Ser и заменами остатка Cys354 на остатки Ala, Ser и Arg. Показано, что замены в 354-м положении не оказывают существенного влияния на каталитические свойства, но приводят к сильной дестабилизации фермента. Замена в 145 положении привела к улучшению константы Михаэлиса по формиату в два раза. Мутация Cys145Ala не влияет, а замена Cys145Ser увеличивает в два раза термостабильность фермента.

5. Разработан метод оценки химической стабильности формиатдегидрогеназ на основе изучения кинетики инактивации фермента пероксидом водорода. С помощью данного метода установлено, что остаток Cys354 не играет важной роли в химической стабильности PseФДГ, в то время как двойная замена Cys145Ser/Cys255Ala повышает такую по сравнению с ферментом дикого типа в 18 раз.

6. Изучена химическая стабильность рекомбинантных ФДГ дикого типа из растений *A. thaliana*, сои *G. max* и бактерий *S. aureus*, синтез которых индуцируется при стрессовых воздействиях. Показано, что такие ферменты демонстрируют высокую устойчивость к инактивации пероксидом водорода, который образуется в клетке в условиях стресса.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, индексируемых в международных базах данных Web of Science, PubMed и Scopus (входят в Перечень рецензируемых научных изданий ВАК РФ):

1. Alekseeva A.A., Serenko A.A., Kargov I.S., **Savin S.S.**, Kleymenov S.Yu. and Tishkov V.I. Engineering catalytic properties and thermal stability of plant formate dehydrogenase by single-point mutations. *Protein Engineering, Design and Selection*, 2012, v.25, N11, p.781-788.
2. Алексеева А.А., **Савин С.С.**, Клейменов С.Ю., Упоров И.В., Пометун Е.В., Тишков В.И. Стабилизация рекомбинантной формиатдегидрогеназы из сои *Glycine max* методом рационального дизайна. *Биохимия*, 2012, т.77, №10, с.1443-1456.
3. Алексеева А.А., **Савин С.С.**, Тишков В.И. NAD⁺-зависимая формиатдегидрогеназа растений. *Acta Naturae*, 2011, т.3, №4(11), с.14-30.
4. Тишков В.И., Углонова С.В., Федорчук В. В., **Савин С.С.** Влияние ионной силы и pH среды на термостабильность дрожжевой формиатдегидрогеназы. *Acta Naturae*, 2010, т.2, №2(5), с.86-92.
5. Гончаренко К.В., **Савин С.С.**, Тишков В.И. Определение наногаммовых количеств формиатдегидрогеназы на мембране. *Вестник Московского Университета, Серия 2: Химия*, 2010, т.51, №3, с.160-163.
6. **Савин С.С.**, Тишков В.И. Инактивация пероксидом водорода как метод оценки стрессовой стабильности формиатдегидрогеназы *in vivo*. *Acta Naturae*, 2010, т.2, №1(4), с.80-84.
7. Тишков В.И., **Савин С.С.**, Хороненкова С.В. Получение биокатализаторов с заданными свойствами. *Известия Академии Наук. Серия Химическая*, 2008, т.57, №5, с.1014-1022.
8. Войнова Н.С., **Савин С.С.**, Алексеева А.А., Скиргелло О.Е., Тишков В.И. Инактивация формиатдегидрогеназ при pH 8. *Вестник Московского Университета, Серия 2: Химия*, 2008, т.49, №2, с.77-80.

Другие публикации в журналах, индексируемых в базах данных Web of Science, PubMed и Scopus (входят в Перечень рецензируемых научных изданий ВАК РФ):

1. Tishkov, V.I., **Savin, S.S.** New generation of biocatalysts for NAD(P)H regeneration based on engineered bacterial formate dehydrogenase. Abstracts of 13th International Biotechnology Symposium. *Journal of Biotechnology*, 2008, v.136S, p.S358.
2. Tishkov V.I., Alekseeva A.A., Serov A.E., Kargov I.S., Skirgello O.E., Zarubina S.A., Kuranova I.P., Polyakov K.M., Popov V.O., Shabalin I.G., **Savin S.S.** Plant formate dehydrogenase: structure – function studies. Abstracts of 38th FEBS Congress. St.Petersburg, Russia, July 6-11, 2013. *FEBS Journal*, 2013, v.280, N S1, p.172.

- Alekseeva A.A., Kargov I.S., Zarubina S.A., **Savin S.S.**, Pometun E.V., Kleimenov S.Y., Tishkov V.I. Management of properties and stability of recombinant formate dehydrogenase from soya *Glycine max* by single-point mutation. Abstracts of 38th FEBS Congress. St.Petersburg, Russia, July 6-11, 2013. *FEBS Journal*, 2013, v.280, N S1, p.172-173.

Тезисы конференций:

- Uglanova S.V., **Savin S.S.**, Tishkov V.I. Characterisation of thermal stability of bacterial and yeast formate dehydrogenases at different pH and phosphate concentration. Congress Proceedings of the IV Moscow International Congress "Biotechnology: State of the Art and Prospects Development". Moscow, March 12-16, 2007, vol. 2, p.300.
- Voinova N.S., Uglanova S.V., **Savin S.S.**, Alexeeva A.A., Serov A.E., Sadykhov E.G. and Tishkov V.I. Media influence on thermal inactivation of formate dehydrogenases from bacteria, yeasts and plants. Abstracts of International Conference "Biocatalysis-2007. Fundamentals & Applications". Moscow – St.Petersburg, June 17-22, 2007, p.159.
- Тишков В.И., **Савин С.С.** Синтез хиральных соединений с помощью оксидоредуктаз. Труды XVIII Менделеевского съезда, Москва, сентябрь 2007г., т.4, с.487.
- Тишков В.И., Упоров И.В., Войнова Н.С., **Савин С.С.**, Полозников А.А., Хушпульян Д.М., Хороненкова С. В. Инженерная энзимология оксидоредуктаз. Сборник трудов IV Съезда Российского общества биохимиков и молекулярных биологов. Новосибирск, май 2008г., с. 44.
- Савин С.С.**, Войнова Н.С., Алексеева А.А., Тишков В.И. Экспрессия в *E.coli* и свойства формиатдегидрогеназ растений. Материалы VIII Международной конференции молодых ученых "Леса Евразии – Северный Кавказ", Москва-Сочи, октябрь 6-12, 2008, с.97-98.
- Alexeeva A.A., Voinova N.S., **Savin S.S.**, Shabalin I.G., Skirgello O.E., Polakov K.M., Popov V.O., Tishkov V.I. Plant recombinant formate dehydrogenases: preparation, stability and structure. Congress Proceedings of the Fifth Moscow International Congress "Biotechnology: State of the Art and Prospects Development". Moscow, March 16-20, 2009, vol. 2, p.311.
- Tishkov V.I., **Savin S.S.** Protein Engineering of Oxidoreductases. Abstracts of International Conference "Biocatalysis-2009. Fundamentals & Applications", Arkhangelsk, June 19-24, 2009, p.14.
- Tishkov V.I., Fedorchuk V.V., **Savin S.S.** Increase of formate dehydrogenase stability by rational design. Program and Abstract Book of the 8th International Conference on Protein Stabilisation (ProStab2009). Graz, Austria, April 14-17, 2009, p.72, P. 40.
- Tishkov V.I., **Savin S.S.**, Khoronenkova S.V. Universal platform for protein engineering. D-amino acid oxidase, formate dehydrogenase and peroxidase as examples. Abstracts of XIII International Conference "INPEC-2009" (International Network of Protein Engineering Centres). Ubatuba, State Sao Paulo, Brasil, October 25-28, 2009, p.19.
- Savin S.S.**, Fedorchuk V.V., Tishkov V.I. Input of different interactions in thermal stability of formate dehydrogenase. Program and Abstracts of International Conference "Thermostable Enzymes. Biodiversity, Molecular Biology and Biogeochemistry of Thermophiles". Petropavlovsk-Kamchatsky, Russia, August 12-18, 2010, p.38.
- Савин С.С.**, Тишков В.И. Инактивация пероксидом водорода как метод оценки стабильности формиатдегидрогеназ *in vivo* при стрессе. Материалы X Международной конференции молодых ученых «Леса Евразии – Подмосковные вечера», Москва, 19-25 сентября, 2010г., с.220-221.
- Savin S.**, Alekseeva A., Romanova E., Goncharenko K. Tishkov V. Plant formate dehydrogenase: expression in *E.coli*, kinetic properties, stability and structural studies. Abstracts of XIV International Conference "INPEC-2010" (International Network of Protein Engineering Centres). Uppsala, Sweden, October 6-9, 2010. P.17.
- Тишков В.И., Хороненкова С.В., Алексеева А.А., Гончаренко К.В., Серенко А.А., Комарова Н.В., Голубев И.В., Рыженкова К.В., Газарян И.Г., Хушпульян Д.М., Березин А.И., Степашкина А.В., Федорчук В.В., Федорчук Е.А., Чубарь Т.А., Савина Л.И., **Савин С.С.** Генно-инженерные ферменты для медицинской диагностики и фармацевтики. Материалы Шестого Московского международного конгресса "Биотехнология: состояние и перспективы развития", Москва, 21-25 марта 2011г., ч.1, с.37-38.
- Тишков В.И., **Савин С.С.** Белковая инженерия ферментов. Тезисы II-ой Международной конференции «Физико-химическая биология», посвященной 85-летию академика Д.Г. Кнорре. Новосибирск, 25-29 июля 2011г., с.35.
- Алексеева А.А., Серенко А.А., **Савин С.С.** Рекомбинантная растительная формиатдегидрогеназа: получение, свойства и практическое применение. XI Международная конференция молодых ученых «Леса Евразии – Брянский лес», Брянск, Россия, 12-18 сентября, 2011г., с.255-256.

16. Тишков, В., **Савин С.** Белковая инженерия ферментов для медицинской диагностики и фармацевтики. 2-я Международная школа «Наноматериалы и нанотехнологии в живых системах. Безопасность и наномедицина»: материалы конференции, Моск. обл., Россия, 19-24 сентября 2011 г. – М., 2011, с. 25-26.
17. Тишков В.И., Алексеева А.А., Серенко А.А., Гончаренко К.В., Серов А.Е., Федорчук В.В., Савина Л.И., **Савин С.С.** Синтез хиральных соединений с помощью оксидоредуктаз. Материалы XIX Менделеевского съезда по общей и прикладной химии. Волгоград, Россия, 25-30 сентября 2011г., т.1, с. 83.
18. Tishkov V., Alekseeva N., Komarova V., **Savin S.** Biocatalysis as solution of ecological problems in synthesis of chiral compounds. Abstract book of the V International Conference-Symposium "Ecological Chemistry". Chishinau, Republic of Moldova, March 2-3, 2012, p.138.
19. Alekseeva A., Goncharenko K., Kargov I., Savina L., **Savin S.**, Tishkov V. Formate dehydrogenase from soya *Glicine max*: structure – function relationship and protein design. Abstracts of the 20th INPEC Conference "Engineering Protein - Systems, Functions and Applications", April 18-20, 2012, Taipei, Taiwan, p. 29.
20. Alekseeva A.A., Goncharenko K.V., Kargov I.S., **Savin S.S.**, Kleimenov S.Yu., Pometun E.V. and Tishkov V.I. Rational design of thermal stability of plant formate dehydrogenase. Book of Abstracts of The 9th International Conference on Protein Stabilization - ProStab2012 "From Molecular Level to Market Applications". Lisbon, Portugal, May 2-4, 2012, P.16.
21. **Savin S.S.**, Goncharenko K.V., Elovik N.A., Alekseeva A.A., Tishkov V.I. Formate dehydrogenase as target for drug and coenzyme regeneration. Programme & Abstracts of V International Meeting "Early events in Human Pathologies". Listvyanka, Baikal, Russia, July 9-12, 2012, p.32.
22. Stepashkina A.V., Alekseeva A.A., **Savin S.S.**, Tishkov V.I. Improving of catalytic properties of plant formate dehydrogenase by rational design. Materials of the XII International conference of young scientists "Forests of Eurasia – Belarusian lake district (Belorusskoye Poozerie)" dedicated to 145th anniversary from the date of Prof. G.F. Morozov's birth. Braslav (Belorussia) and Ignalina (Lithuania), September, 30 – October, 6, 2012. – М.: MSFU, 2012, p. 348.
23. Тишков В.И., Алексеева А.А., Зарубина С.А., Каргов И.С., Степашкина А.В. Федорчук В.В., Федорчук Е.А., Захарова Г.С., Упоров И.В., Комарова Н.В., Полозников А.А., **Савин С.С.** Белковая инженерия ферментов для тонкого органического синтеза, фармацевтики и медицинской диагностики. Тезисы докладов VII Московского международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития», Москва, 19-22 марта 2013 г., М: ЗАО «Экспо-биохим-технологии», РХТУ им. Д.И. Менделеева, ISSN 5-7237-0372-2, 2013, ч. II, с.139.
24. Alekseeva A.A., **Savin S.S.**, Kargov I.S., Zarubina S.A., Kleimenov S.Yu., Pometun E.V., Tishkov V.I. Protein engineering of formate dehydrogenase: from bacteria to plants. Abstracts of 9th International Conference "Biocatalysis - 2013: Fundamentals & Applications". Moscow, July 2-5, 2013, p. 28.

Заявки на выдачу патента РФ на изобретение

1. Тишков В.И., Алексеева А.А., **Савин С.С.**, Савина Л.И., Пометун Е.В., Труфманова Е.П. Мутантная растительная форматдегидрогеназа (варианты). Заявка 2012141254 от 27.09.2012 на выдачу патента РФ на изобретение.
2. Тишков В.И., Алексеева А.А., **Савин С.С.**, Савина Л.И., Каргов И.С. Мутантная форматдегидрогеназа (варианты). Заявка 2012142250 от 05.10.2012 на выдачу патента РФ на изобретение.