

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
им М.В. Ломоносова
Химический факультет

На правах рукописи

ФЕДОРЧУК
Владимир Витальевич

**ПОВЫШЕНИЕ ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТИ
БАКТЕРИАЛЬНОЙ ФОРМИАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ
МЕТОДОМ НАПРАВЛЕННОГО МУТАГЕНЕЗА**

02.00.15 - химическая кинетика и катализ

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва - 2000

Работа выполнена на кафедре химической энзимологии Химического факультета Московского Государственного Университета им. М.В. Ломоносова

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ:

доктор химических наук, профессор

В.И. Тишков

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ:

доктор химических наук, профессор

А.Г. Габибов

доктор биологических наук, профессор

А.В. Максименко

ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ:

Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН

Защита диссертации состоится "20" июня 2000 г. в 16 часов на заседании Диссертационного совета Д 053.05.76 по химическим наукам при Московском Государственном Университете им М.В. Ломоносова по адресу:

119899, Москва, Воробьевы горы, МГУ им М.В. Ломоносова, Химический факультет, кафедра Химической энзимологии, аудитория 202.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Химического факультета МГУ

Автореферат разослан "19" мая 2000 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета,
кандидат химических наук

И.К. Сакодынская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Последние десятилетия биотехнологические процессы все больше и больше теснят классические технологии. Ферменты используются в пищевой и текстильной промышленности, в производстве лекарственных препаратов и тонком органическом синтезе, в аналитических системах и как добавки к различным моющим средствам. Однако более активное внедрение ферментативных процессов в различные области человеческой деятельности сдерживается рядом факторов. К этим факторам можно отнести: трудность отделения ферментов от исходных реагентов и продуктов реакции по завершении процесса; недостаточная стабильность большинства ферментов; трудоемкость получения чистых ферментов в больших количествах; дороговизна кофакторов многих ферментов, что исключает их промышленное использование без систем регенерации кофактора.

Одним из ферментов, который в настоящее время представляет большой теоретический и практический интерес, является NAD^+ -зависимая формиатдегидрогеназа (КФ 1.2.1.2, ФДГ). Этот фермент катализирует реакцию окисления формиат-иона до углекислого газа при сопряженном восстановлении NAD^+ до NADH и интересен тем, что является наилучшим ферментом для систем регенерации NADH , который используется в качестве кофактора несколькими сотнями дегидрогеназ. Превосходство ФДГ над другими ферментами при использовании в системе регенерации NADH обусловлено необратимостью катализируемой реакции, широким рН-оптимумом, строгой специфичностью фермента, а также дешевизной второго субстрата - формиата. Среди известных формиатдегидрогеназ наиболее высокой удельной активностью и стабильностью обладает изучаемая в нашей лаборатории ФДГ из метилотрофных бактерий *Pseudomonas sp.101*. Ген этого фермента был клонирован и экспрессирован в клетках *E. coli*. Оказалось, что благодаря отсутствию посттрансляционной модификации ФДГ в клетках *E. coli* рекомбинантный фермент превосходит по своим кинетическим характеристикам нативную ФДГ, выделенную из *Pseudomonas sp.101*. Оптимизированная система экспрессии ФДГ позволяет получить фермент в растворимой и активной форме с выходом до 50-60% от всех растворимых белков *E. coli*. В нашей лаборатории также была получена мутантная ФДГ специфичная к NADP^+ . Этот мутант был успешно использован для создания системы регенерации NADPH .

Несмотря на то, что ФДГ из *Pseudomonas sp.*101 является самой стабильной из всех известных в настоящее время формиадегидрогеназ, ее стабильность в ряде случаев недостаточна, например, для использования в системах регенерации NADH с сопряженными ферментами из термофилов. Кроме того, изучение связи структуры и стабильности белков является одной из актуальнейших задач и фундаментальной науки. В нашей лаборатории проводились эксперименты по повышению термостабильности ФДГ с использованием подходов, основанных на гидрофобизации α -спиралей и вытеснении молекул воды из внутренних полостей белковой глобулы. В результате был получен содержащий шесть аминокислотных замен мутант формиадегидрогеназы Т6. Этот мутант был в 9 раз стабильнее исходного фермента, причем такое повышение стабильности было достигнуто без изменения кинетических характеристик ФДГ. Однако, кроме гидрофобных, существенное влияние на стабильность белковой глобулы могут оказывать и другие взаимодействия. Одними из самых сильных среди нековалентных взаимодействий являются электростатические. Роль этих взаимодействий в стабильности нашего фермента еще не исследовалась. Кроме того, анализ карты Рамачандрана свидетельствует, что ряд аминокислотных остатков имеет конформацию далекую от оптимальной. Поэтому оптимизация электростатических взаимодействий и снятие конформационных напряжений могут быть одними из путей дальнейшего повышения стабильности ФДГ.

Цель и задачи исследования. Целью данной работы являлось: 1) дальнейшее повышение термостабильности ФДГ с использованием подходов, основанных на оптимизации электростатических взаимодействий в белковой глобуле и снятии конформационных напряжений в полипептидной цепи; 2) объединение полученных в нашей работе положительных для термостабильности ФДГ мутаций в один многоточечный мутант на основе термостабильного мутанта Т6; и 3) разработка и оптимизация системы крупномасштабного выделения формиадегидрогеназы с помощью двухфазных систем на основе ПЭГ-соль-вода с включением стадии термообработки для денатурации примесных белков.

Научная новизна. Проведено сравнительное изучение процесса термоинактивации двух бактериальных формиадегидрогеназ в растворах с различной ионной силой. Показана соизмеримая роль электростатических и гидрофобных взаимодействий в стабилизации формиадегид-

рогеназы из *Pseudomonas sp.*101 и преобладание гидрофобных взаимодействий в стабилизации фермента из *Moraxella C-2*.

Изучение четырех мутантов формиатдегидрогеназ из *Pseudomonas sp.*101 и *Mycobacterium vaccae* N10 показало важную роль ионной пары Asp43 - Lys61 в стабильности фермента. Разрушение этой ионной пары приводит к 6-кратному снижению стабильности фермента. Также было показано, что структура фермента в этой области может быть стабилизирована не только ионной парой, но и путем увеличения жесткости полипептидной цепи за счет введения в положение 61 остатка пролина.

Проведен анализ взаимного расположения и взаимодействия всех заряженных аминокислотных остатков в белковой глобуле ФДГ из *Pseudomonas sp.*101. Показано, что большинство заряженных аминокислотных остатков принимают участие в сложных многоточечных электростатических взаимодействиях, образуя так называемую “сеть зарядов”, и что возможно повышение стабильности фермента за счет оптимизации электростатических взаимодействий. Получено 7 мутантов формиатдегидрогеназы и изучены их кинетические свойства и термостабильность. Показано, что отдельные точечные мутации обеспечивают повышение термостабильности фермента в среднем от 5 до 40%, без изменения его кинетических параметров.

Анализ карты Рамачандрана для формиатдегидрогеназы из *Pseudomonas sp.*101 выявил наличие остатка Ala198, который находится в “неоптимальной” конформации и вносит сильное напряжение в структуру полипептидной цепи фермента. Кроме того, этот остаток лежит в первом положении канонической последовательности GxGxxG кофермент связывающего домена всех дегидрогеназ. Эта последовательность очень консервативна и только в 5 из более чем 700 структур различных дегидрогеназ в этом месте расположен остаток аланина, а все остальные ферменты содержат глицин. Снятие конформационного напряжения в результате мутации Ala198Gly привело к повышению стабильности фермента 2,5 раза, а также улучшению сродства ФДГ к NAD^+ в 2 раза.

Объединение этой мутации с полученным ранее мутантом Т6 привело к стабилизации формиатдегидрогеназы в 2 и 18 раз по сравнению с мутантом Т6 и ферментом дикого типа, соответственно.

Практическая значимость работы. Увеличение термостабильности формиатдегидрогеназы без ухудшения ее кинетических параметров

позволило получить биокатализатор для систем регенерации NAD(P)H с повышенной операционной стабильностью. Разработанная система крупномасштабной очистки формиатдегидрогеназы (на основе двухфазных систем ПЭГ-соль-вода) позволяет совместно с разработанной ранее высокоэффективной системой экспрессии фермента начать промышленное использовать бактериальной формиатдегидрогеназы вместо используемой сейчас гораздо менее стабильной дрожжевой ФДГ. Включение в процедуру очистки стадии термообработки позволяет получать технические препараты формиатдегидрогеназы с чистотой до 90%.

Апробация работы. Основные результаты работы были представлены на следующих Международных конференциях: “Biocatalysis-95: Fundamentals & Applications” (Suzdal, Russia, August 27-31, 1995), Engineering Foundation Conference “Enzyme Engineering XIII” (San Diego, USA 1995), Engineering Foundation Conference on Separation Technology VII “Separation for Clean Production” (Davos, Switzerland, October 26-31, 1997), “Biocatalysis-98: Fundamentals & Applications” (Puschino on Oka, Russia, June 13-18, 1998), “Biocatalysis-2000: Fundamentals & Applications” (Moscow, Russia, June 10-15, 1998), а также на Втором съезде Биохимического общества Российской Академии Наук (Москва, 19-23 мая 1997 г).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 5 работ.

Структура и объем работы. Диссертация построена по традиционной схеме и состоит из введения, обзора литературы (2 главы), описания материалов и методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы, содержащего 140 ссылок. Работа изложена на 122 страницах, содержит 31 рисунок и 8 таблиц.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. Все реактивы, использованные в экспериментах по генной инженерии, были марки "Molecular Biology Grade". Для проведения реакции мутагенеза использовали ДНК-полимеразу фага T4 (10 ед/мкл), полинуклеотидкиназу фага T4 (10 ед/мкл), ДНК-лигазу фага T4 (400 ед/мкл) фирмы "New England Biolabs" (США). Очистку воды производили на установке MilliQ фирмы "Millipore" (США).

В работе использовали следующие штаммы бактерий *E.coli*: TG1, JM-109, BL21(DE3) и RZ1023. Культивирование бактерий проводили на

среде, содержащей дрожжевой экстракт, бактотриптон (оба фирмы "Difco", США) и хлорид натрия фирмы "Merck" (Германия).

В экспериментах по очистке и изучению свойств формиатдегидрогеназы использовались: одно- и двузамещенный фосфат калия, формиат натрия, сульфат аммония, ПЭГ с молекулярной массой 400, 1500 и 20000 фирмы "Merck" (Германия); NAD^+ с чистотой не менее 99% фирмы "Bioto1" (Германия).

Методы исследования. Все генно-инженерные манипуляции проводили согласно Manniatis et al, 1982. Олигонуклеотиды синтезировали на автоматическом синтезаторе "Биосан АСМ 103U" (Новосибирск) с использованием набора реагентов фирмы "Applied Biosystems" (США). Секвенирование ДНК осуществляли на автоматическом секвенаторе на флуоресцентных красителях фирмы "Applied Biosystems" модель 370A (США) и набора "ABI PRISM" Sequencing Kit. Плазмидную ДНК выделяли с помощью набора фирмы "QIAGEN" (США). Направленный мутагенез проводили по методу Кункеля. Белковая часть включала выделение и очистку формиатдегидрогеназы, измерение активности и констант Михаэлиса, электрофорез в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях, изучение термостабильности, выделение ФДГ с использованием двухфазных систем.

Выделение и очистка. Очистку нативных и мутантных формиатдегидрогеназ, экспрессированных в клетках *E.coli*, проводили по стандартной методике, разработанной для ФДГ из *Pseudomonas sp.* 101. Процедура очистки фермента включала разрушение клеток на ультразвуковом дезинтеграторе "BraunSonic" (Германия), высаживание части балластных белков сульфатом аммония (35% от насыщения), гидрофобную хроматографию на системе FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) фирмы "Pharmacia" (Швеция) с использованием носителя фенол-сефароза той же фирмы и гель-фильтрацию на колонке с сефадексом G50.

Измерение активности. Активность формиатдегидрогеназы определяли на спектрофотометре UV-1601PC фирмы "Shimadzu" при 37 °С по накоплению NADH на длине волны 340 нм ($\epsilon_{340}=6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Измерения проводили в 0,1М калий-фосфатном буфере, pH 7,0 и концентрациях формиата натрия и NAD^+ 0,3 М и 2 мг/мл, соответственно. Точные концентрации исходных растворов NAD^+ определяли спектрофотометрически на длине волны 260 нм ($\epsilon_{260}=17800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Точную концентрацию формиата

натрия определяли в тех же условиях, что и активность ФДГ, по конечной концентрации NADH в условиях избытка NAD⁺.

Исследование термостабильности. Образец фермента в соответствующем буфере (2 мл) помещался в термостат и через определенные промежутки времени отбирали пробы объемом 50 мкл для определения остаточной активности. Интервал между отбором проб подбирали таким образом, чтобы за время эксперимента активность фермента в образцах упала в 4-10 раз. Константу скорости термоинактивации определяли по тангенсу угла наклона прямой на графике зависимости натурального логарифма остаточной ферментативной активности от времени.

Выделение ФДГ с использованием двухфазных систем. Для создания первой двухфазной системы к суспензии разрушенной биомассы добавляли необходимые количества воды, ПЭГ-1500 (в виде 50% раствора), K₂HPO₄, формиата натрия и перемешивали. Систему оставляли на ночь для полного разделения фаз. ФДГ переходила в верхнюю, богатую ПЭГом фазу, а клеточный дебрис - в нижнюю. Для создания второй системы использовали верхнюю фазу из первой системы. К ней добавляли воду, ПЭГ-20000 (в виде 10% раствора), KH₂PO₄ и формиат натрия. После разделения фаз в течение 2-3 часов отбирали нижнюю фазу с ФДГ. Стадию термообработки проводили инкубированием 20% суспензии разрушенной биомассы клеток *E.coli* при соответствующей температуре в течение заданного промежутка времени.

Анализ трехмерной структуры. Анализ трехмерной структуры апо- и холоформ ФДГ из *Pseudomonas sp.*101 проводили с использованием программ “RasMol” версий 2.5 и 2.6b, “WebLab Viewer” (MSI) и “Swiss PBD Viewer” версии 3.51. Для подготовки высококачественных изображений структуры фермента применяли программу “POV-Ray” версии 3.1e.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние ионной силы на термостабильность ФДГ. Для выяснения роли электростатических взаимодействий в стабильности бактериальной формиатдегидрогеназы был изучен процесс термоинактивации в растворах с различной ионной силой для ферментов из *Pseudomonas sp.*101 и *Moraxella C-2* при 60 и 57 °С, соответственно. В первом эксперименте варьировалась концентрация калий-фосфатного буфера от 0,01М до 1,0М (рН 7,0). На рисунке 1 представлена зависимость константы

скорости термоинактивации ФДГ из *Pseudomonas sp.*101 от концентрации буфера. Вначале при увеличении ионной силы раствора наблюдается уменьшение стабильности фермента, что можно объяснить повышением диэлектрической проницаемости среды и ослаблением электростатических взаимодействий. Однако при больших концентрациях соли стабильность вновь начинает повышаться вследствие усиления гидрофобных взаимодействий. Близкий к симметричному вид зависимости свидетельствует о примерно равном вкладе гидрофобных и электростатических взаимодействий в стабилизацию этого фермента. На рисунке 2 приведена аналогичная зависимость для ФДГ из *Moraxella C-2*. В этом случае не наблюдается сильного ухудшения стабильности на начальном участке зависимости, в то время как при больших концентрациях соли также наблюдается сильная стабилизация. Из этого можно сделать вывод о большей роли гидрофобных взаимодействий по сравнению с электростатическими в стабильности ФДГ из *Moraxella C-2*.

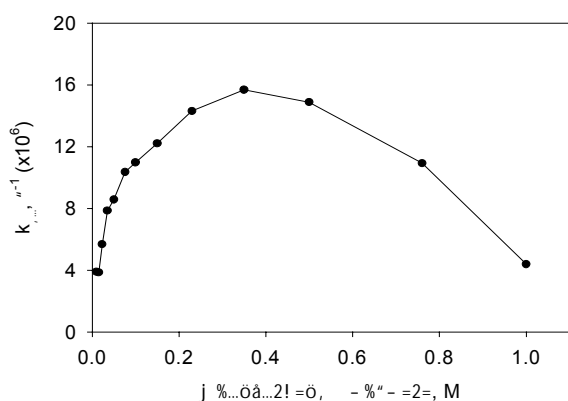


Рис. 1. Зависимость константы скорости термоинактивации ФДГ из *Pseudomonas sp.*101 от концентрации калий-фосфатного буфера (рН 7,0, 60 °С).

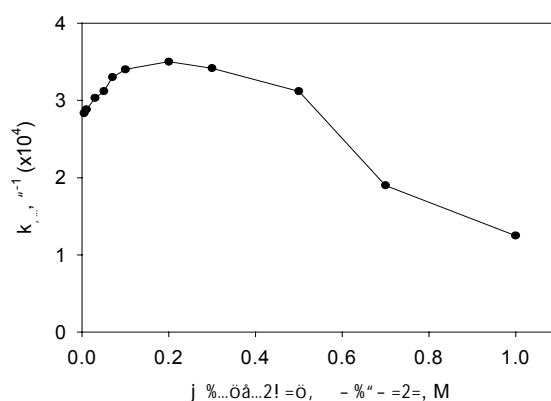


Рис. 2. Зависимость константы скорости термоинактивации ФДГ из *Moraxella C-2* от концентрации калий-фосфатного буфера (рН 7,0, 57 °С).

В следующем эксперименте изучалась термоинактивация формиат-дегидрогеназы в растворах NaCl от 0,025M до 4,5M (0,01M калий-фосфатный буфер, рН 7,0) (рис. 3 и 4). В этом случае наблюдается экспоненциальный рост константы термоинактивации при повышении концентрации соли. Возможно это связано с тем, что хлорид ион гораздо меньше фосфата и при высоких концентрациях способен проникать внутрь белковой глобулы, вызывая сильную дестабилизацию фермента.

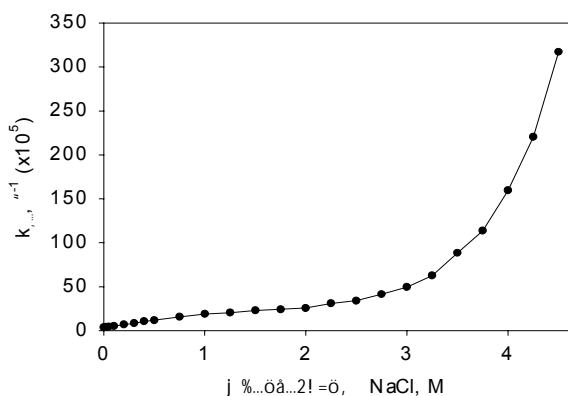


Рис. 3. Зависимость константы скорости термоинактивации ФДГ из *Pseudomonas sp.101* от концентрации NaCl (рН 7,0, 60 °С).

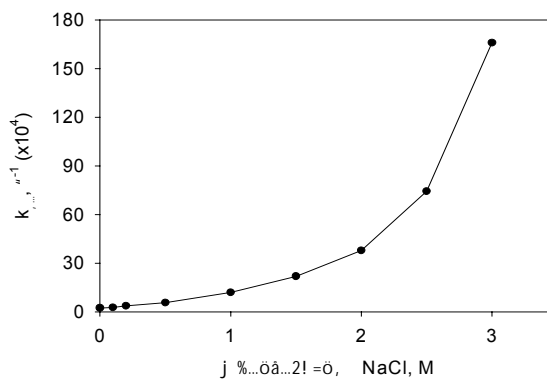


Рис. 4. Зависимость константы скорости термоинактивации ФДГ из *Moraxella C-2* от концентрации NaCl (рН 7,0, 57 °С).

При практическом применении формиатдегидрогеназы в системах ферментативного синтеза для достижения большого количества циклов кофермента необходимо использовать как можно более высокие концентрации субстратов (до 2-3 М), в том числе и формиата. Поэтому нами была также изучена термоинактивация ФДГ при различных концентрациях формиата. Полученные зависимости имеют черты обоих предыдущих случаев. В случае фермента из *Pseudomonas sp.101* вначале наблюдается дестабилизация фермента, затем небольшая стабилизация и наконец при концентрациях формиата более 1,5 М начинается экспоненциальное падение стабильности.

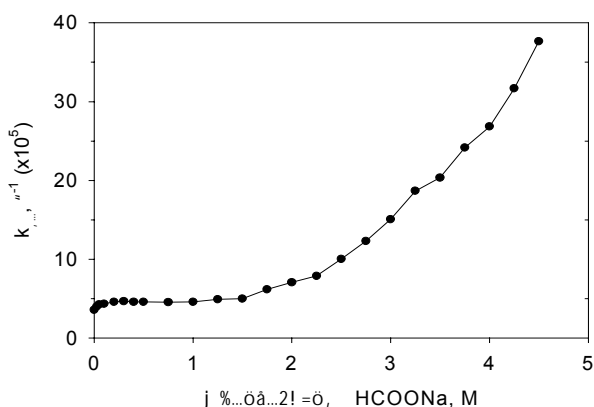


Рис. 5. Зависимость константы скорости термоинактивации ФДГ из *Pseudomonas sp.101* от концентрации формиата натрия (рН 7,0, 60 °С)

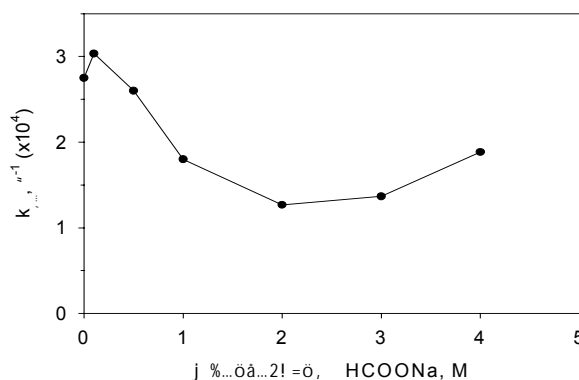


Рис. 6. Зависимость константы скорости термоинактивации ФДГ из *Moraxella C-2* от концентрации формиата натрия (рН 7,0, 57 °С)

Для ФДГ из *Moraxella C-2* вначале происходит совсем незначительное падение стабильности, затем ее существенное увеличение и только при концентрации формиата более 2,5 М снова наблюдается падение стабильности. Эти данные с одной стороны еще раз подтверждают

гораздо более важную роль гидрофобных взаимодействий в стабильности фермента из *Moraxella* C-2. А с другой стороны свидетельствуют, что при концентрациях формиата до 2-2,5М, т.е. тех, которые могут потребоваться на практике, не происходит дестабилизации ФДГ как из *Pseudomonas* sp.101, так и из *Moraxella* C-2.

Роль остатка в положении 61 в стабильности ФДГ. Все дрожжевые формиатдегидрогеназы обладают гораздо меньшей стабильностью по сравнению с бактериальными. При этом основным их структурным различием является наличие на N-конце бактериальных ФДГ дополнительных 35 аминокислот (рис. 7).

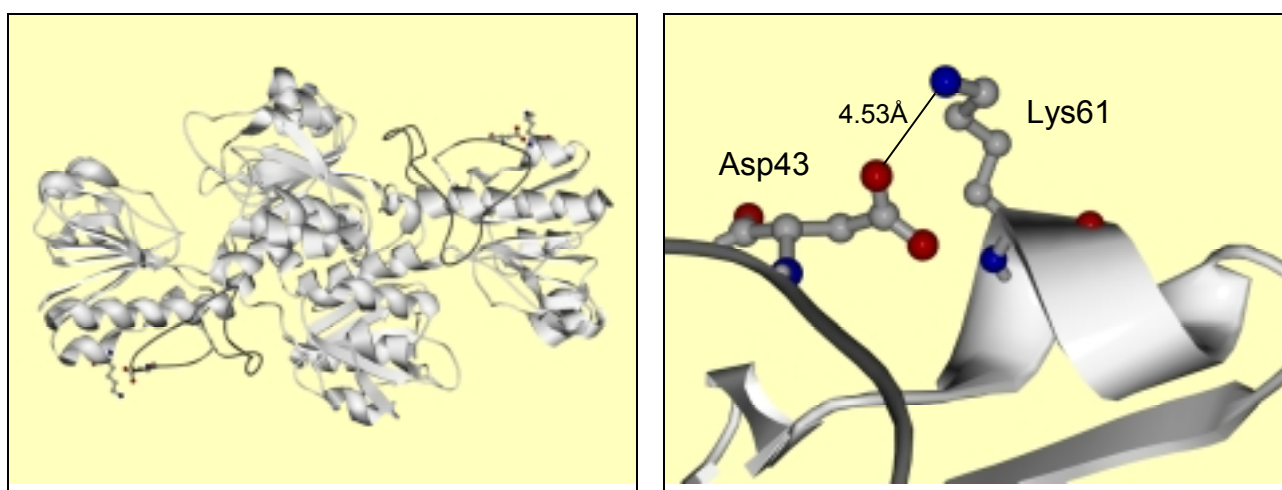
	β1	3/10-1A	α1
<----->.10.....'.....30.....'.....50.....<-----><----->..		
PseFDHAKVLCVLYDDPVDGYPKTYARDDLPKIDHYPGGQ T L P T P KAI D FT P GQLG S VSGELGLR K YLESNG		
MycFDHAKVLCVLYDDPVDGYPKTYARDDLPKIDHYPGGQ I L P T P KAI D FT P GQLG S VSGELGLR E YLESNG		
MorFDHAKVVCVLYDD P INGY P TSYARDDL P RIDKY P DGQ T L P T P KAI D FT P GALLG S VSGELGLR K YLESQG		
StuFDH	ELQASPGPKKIVGVFYKAN-----EYAEMN-----P NFVGCVEGALGIR E WLESKG		
BarFDH	AAHTSAGSKKIVGVFYQAG-----EYADKN-----P NFVGCVEGALGIR D WLESKG		
SceFDHSKGKVLVLYEGG-----KHAEEQ-----E KLLGCIENELGIA N WLKDQG		
CmeFDHKIVLVLYDAG-----KHAADE-----E KLYGCTENKLGIA N WLKDQG		
HanFDHKVVLVLYDAG-----KHAQDE-----E RLYGCTENALGIR D WLEKQG		
NeuFDHVKVLAVLYDGG-----KHGEEV-----P ELLGTIQNELGLR K WLEDQG		
AspFDHVLVDGG-----SHAKDQ-----P LLGTTENELGIR K WIEEQG		

Рис. 7. Сравнение аминокислотных последовательностей N-концевых областей формиатдегидрогеназ из различных источников: PseFDH - *Pseudomonas* sp.101, MycFDH - *M. vaccae* N10, MorFDH - *Moraxella* sp.C-1, StuFDH - картофель, BarFDH SceFDH - пекарские дрожжи, CmeFDH - *Candida methylica*, HanFDH - *Pichia angusta* (бывшая *Hansenula polymorpha*), NeuFDH - *Neuraspora crassa*, AspFDH - *Aspergillus nidulans*. Последовательности ФДГ из картофеля и ячменя указаны без сигнальных пептидов. В последовательностях выделены остатки в положениях 35, 43 и 61, а также 7 остатков пролина в петле 11-46 у бактериальных формиатдегидрогеназ.

Этот участок представляет из себя длинную неструктурированную петлю. Можно предположить, что взаимодействие аминокислотных остатков этой дополнительной петли с остатками остальной части белковой глобулы и является одной из причин более высокой стабильности бактериальных ФДГ. Для проверки этой гипотезы очень хорошо подходит формиатдегидрогеназа из бактерий *Mycobacterium vaccae* N10 (MycФДГ). Этот фермент отличается от ФДГ из *Pseudomonas* sp.101 (PseФДГ) всего двумя аминокислотными остатками - Ile35 вместо Thr и Glu61 вместо Lys, однако скорость его термоинактивации в 6 раз выше.

Анализ пространственной структуры формиатдегидрогеназы из *Pseudomonas* sp.101 показал, что остаток Lys61, расположенный в начале спирали α1, образует ионную пару с остатком Aps43, находящимся в

неструктурированной петле (рис. 8). В случае же фермента из *M. vaccae* N10 в положении 61 вместо положительно заряженного Lys расположен отрицательно заряженный остаток Glu. Для выяснения роли аминокислотных остатков в положениях 35 и 61 в стабильности бактериальной ФДГ был получен ряд мутантов фермента из *M. vaccae* N10. В первом из них (Glu61Gln) для удаления пары одноименных зарядов отрицательно заряженный остаток глутаминовой кислоты был заменен на нейтральный глутамин. Во втором мутанте (Glu61Lys) была воссоздана ионная пара как в ферменте из *Pseudomonas sp.101*. В третьем мутанте (Glu61Pro) был удален отрицательный заряд и одновременно повышена жесткость полипептидной цепи.



А

Б

Рис. 8. А. Структура холо-формы ФДГ из *Pseudomonas sp.101*. черным цветом выделена эукариотических форматдегидрогеназах. Б - увеличенное изображение ионной пары Asp43 - Lys61.

На рисунке 9 представлена зависимость натурального логарифма остаточной ферментативной активности от времени для ФДГ из *Pseudomonas sp.101* и *M. vaccae* N10, а также их мутантов по 61-му положению. Линейный вид этих зависимостей свидетельствует о том, что процесс термоинактивации ФДГ протекает в соответствии с кинетикой реакции первого порядка без предварительной диссоциации на отдельные субъединицы.

Изучение температурных зависимостей процесса термоинактивации данных ферментов в диапазоне температур 54-65 °С показало, что процесс термоинактивации может быть описан при помощи теории активированного комплекса и, что для всех мутантов различие в термостабильности обусловлено в первую очередь энтропийным фактором.

Как следует из рисунка 9, аминокислотный остаток в положении 61 играет гораздо большую роль в стабильности ФДГ, чем остаток в положении 35.

Простое удаление отрицательного заряда за счет мутации Glu61Gln не приводит к образованию фермента сравнимого по стабильности с PseФДГ, поскольку константа скорости инактивации этого мутанта в 2,5 раза больше, чем у фермента дикого типа. После восстановления электростатических взаимодействий в мутанте МусФДГ Glu61Lys получается фермент близкий по стабильности к нативной PseФДГ - константа скорости инактивации по сравнению с МусФДГ уменьшается в 4,5 раза или на 350%. Мутант МусФДГ Glu61Lys отличается от PseФДГ только наличием в положении 35 остатка Ile вместо Thr. Константа скорости термоинактивации этого мутанта всего в 1,5 раза (или на 50%) больше, чем для ФДГ из *Pseudomonas* sp.101. Анализируя вышеприведенные эффекты стабилизации, можно сделать вывод, что соотношение вкладов в термостабильность PseФДГ остатков в 35 и 61 положениях составляет 1:7 (50%:350%).

Наблюдаемые в наших экспериментах изменения термостабильности довольно малы по сравнению с эффектами, которые следовало бы ожидать при оптимизации электростатических взаимодействий. Данные рентгеноструктурного анализа как для апо-, так и для холо-формы PseФДГ свидетельствуют, что карбоксильная группа Asp43 и аминоклупа Lys61 полностью экспонированы в раствор (рис. 8), т.е. эффективность взаимодействия двух противоположно заряженных групп сильно ослабляется за счет высокой диэлектрической проницаемости воды. Этим, по-видимому, можно объяснить и отсутствие повышения термостабильности PseФДГ после замены Lys61Arg.

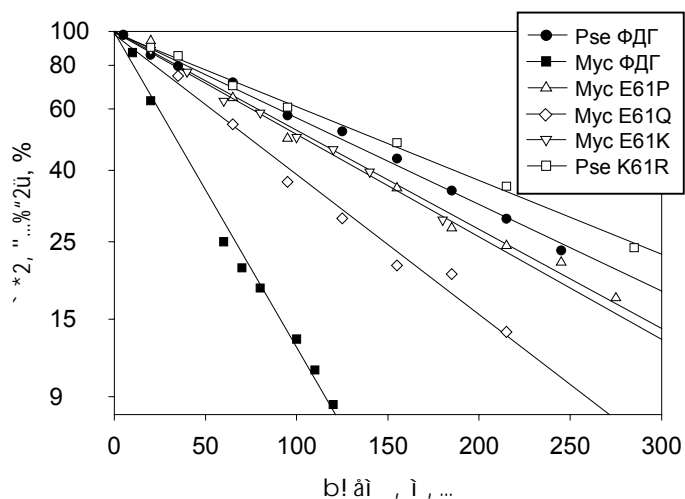


Рис. 9. Зависимость остаточной ферментативной активности от времени для формилдегидрогеназ из *Pseudomonas* sp.101, *M. vaccae* N10 и их мутантов по 61 положению (0,1М калий-фосфатный буфер, pH 7,0, 60 °С).

Петлю в районе остатков 11-46 в бактериальных формиаатдегидрогеназах можно назвать "неструктурированной" достаточно условно, т.к. ее конформация довольно жестко зафиксирована благодаря наличию в ней 7 остатков Pro. Анализ изменения термостабильности фермента после мутации Glu61Pro (рис. 9) наводит на мысль, что электростатические взаимодействия между 43 и 61-ым остатками могут быть необходимы для стабилизации не самой уже достаточно жесткой "неструктурированной" петли 11-46, а для фиксации участка полипептидной цепи в районе 61-го остатка. Lys61 является вторым остатком в спирали $\alpha 1$ (рис. 7), и, исходя из общих соображений, мутация Lys61Pro должна была бы привести к существенному изменению конформации этой спирали. Однако, результаты компьютерного моделирования структуры этого мутанта свидетельствуют, что введение остатка Pro в положении 61 почти не искажает конформацию спирали $\alpha 1$. На первый взгляд это выглядит довольно неожиданно, но похожая ситуация наблюдается в самой PseФДГ в случае Pro105, находящегося во втором положении спирали $\alpha 3$. Получение в результате замены Glu61Pro в MucФДГ такого же по стабильности мутанта, что и в случае замены Glu61Lys является сильным аргументом в пользу высказанного предположения.

Таким образом, проведенные нами эксперименты показали, что "неструктурированная" петля в районе аминокислотных остатков 11-46, имеющаяся во всех формиаатдегидрогеназах из бактерий и отсутствующая в аналогичных ферментах из эукариот, является одной из причин более высокой стабильности бактериальных ФДГ. Полученные данные свидетельствуют, что одним из "слабых" мест в структуре бактериальной ФДГ является участок полипептидной цепи в районе 61-го аминокислотного остатка. Этот участок может быть стабилизирован как за счет электростатических взаимодействий с Asp43, расположенном в "неструктурированной" петле, так и путем повышения жесткости полипептидной цепи за счет введения в положение 61 остатка Pro.

Оптимизация электростатических взаимодействий в молекуле ФДГ. Для оптимизации электростатических взаимодействий в глобуле формиаатдегидрогеназы была написана специальная компьютерная программа, и с ее помощью проанализировано взаимное расположение и взаимодействие друг с другом всех заряженных остатков. Оказалось, что большинство взаимодействий - это не просто взаимодействия между парой заряженных атомов, а сложные многоточечные взаимодействия, так называемые сети зарядов. Это существенно усложняет внесение

изменений в такую систему. В результате анализа было выбрано несколько положений - Asp13, Glu106, Glu170 и Glu391, и был получен ряд мутантов ФДГ, которые по нашему мнению, должны были обладать повышенной по сравнению с ферментом дикого типа стабильностью.

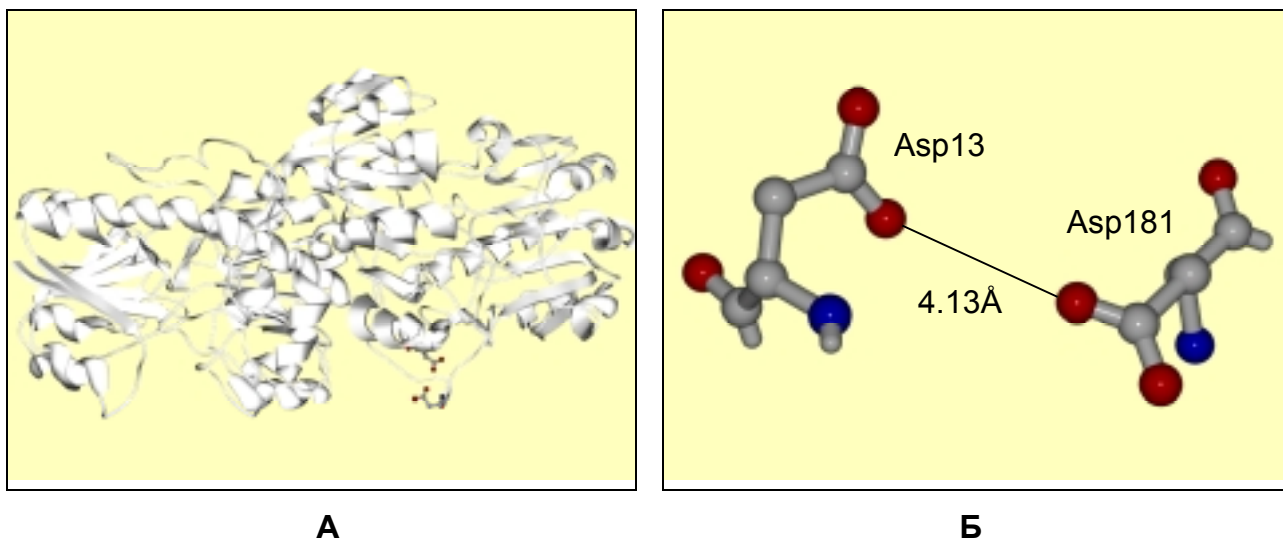


Рис. 10. Положение остатков Asp13 и Asp181 в холо-форме формиатдегидрогеназы из *Pseudomonas sp.101*. (A) и увеличенное изображение пары Asp13 - Asp181 (Å).

Остаток Asp13 расположен в неструктурированной области на поверхности белковой глобулы и пространственно сближен с остатком Asp181 (рис. 10). Для удаления дестабилизирующего отталкивания между двумя отрицательными зарядами и создания стабилизирующей ионной пары Asp13 был заменен на остатки Lys и Arg. Однако, полученные мутанты оказались соответственно в 6 и 8 раз менее стабильными, чем нативный фермент (рис. 11). Asp13 расположен в области β -изгиба первого рода (положение $i+2$) и по данным статистического анализа большого количества структур, является наиболее предпочтительным для данного положения. Вероятности нахождения в данном положении остатков лизина и аргинина ниже в 2,5 и 3 раза соответственно. Таким образом, оказалось, что дестабилизирующий эффект от

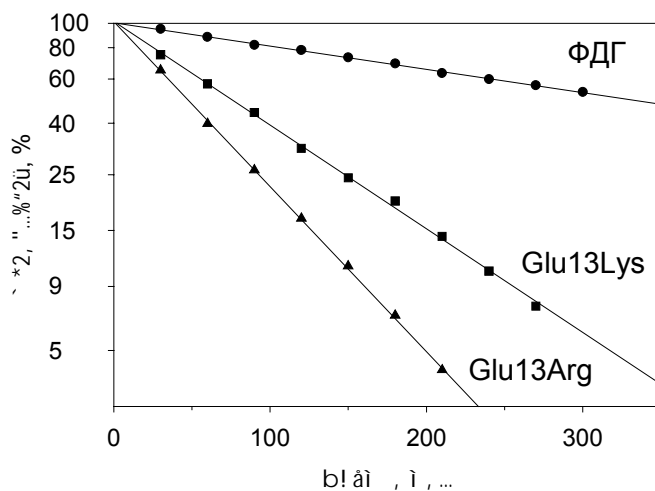


Рис. 11. Зависимость остаточной ферментативной активности от времени для нативной формиатдегидрогеназы и ее мутантов по 13 положению (0,1М калий-фосфатный буфер, pH 7,0, 60 °C).

внесения напряжения в конформацию полипептидной цепи в положении 13 за счет замены на структурно-неоптимальные аминокислотные остатки превосходит стабилизирующий эффект от замены одноименной пары зарядов на разноименную.

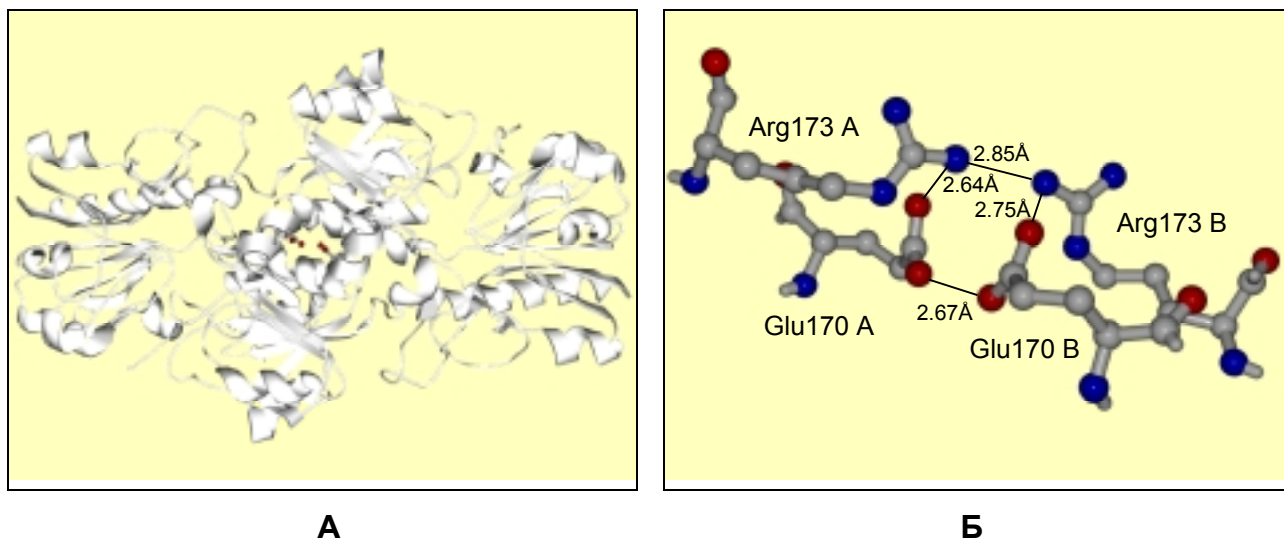


Рис. 12. Положение остатков Glu170A и Glu170B в холо-форме формиатдегидрогеназы из *Pseudomonas sp.*101. (А) и фрагмент многоточечного электростатического взаимодействия включающего эти остатки (Б).

Остаток Glu170 расположен в центре белковой глобулы в области межсубъединичного контакта. При этом остаток Glu из одной субъединицы расположен в непосредственной близости от аналогичного остатка из другой субъединицы (рис. 12). Эти два остатка кроме взаимодействия друг с другом, участвуют еще в целом ряде электростатических взаимодействий. Поэтому для уменьшения взаимного отталкивания без сильного изменения

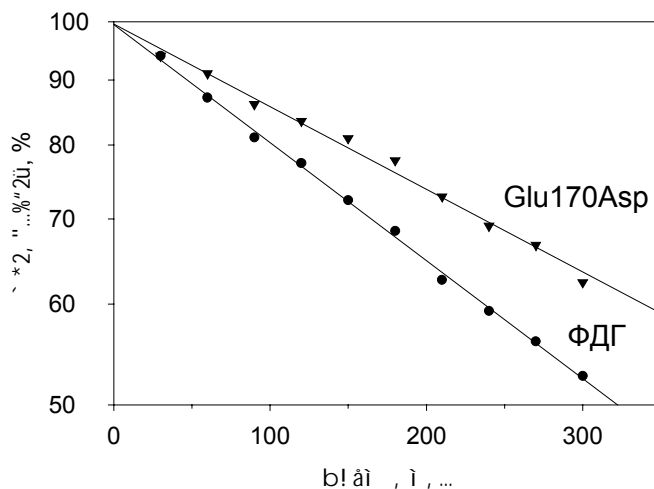


Рис. 13. Зависимость остаточной ферментативной активности от времени для нативной формиатдегидрогеназы и мутанта Glu170Asp (0,1М калий-фосфатный буфер, pH 7,0, 60 °C).

остальной системы взаимодействий Glu170 был заменен на остаток Asp, который короче остатка Glu на одну CH₂-группу. Полученный мутант Glu170Asp оказался на 40% стабильнее исходного фермента (рис. 13).

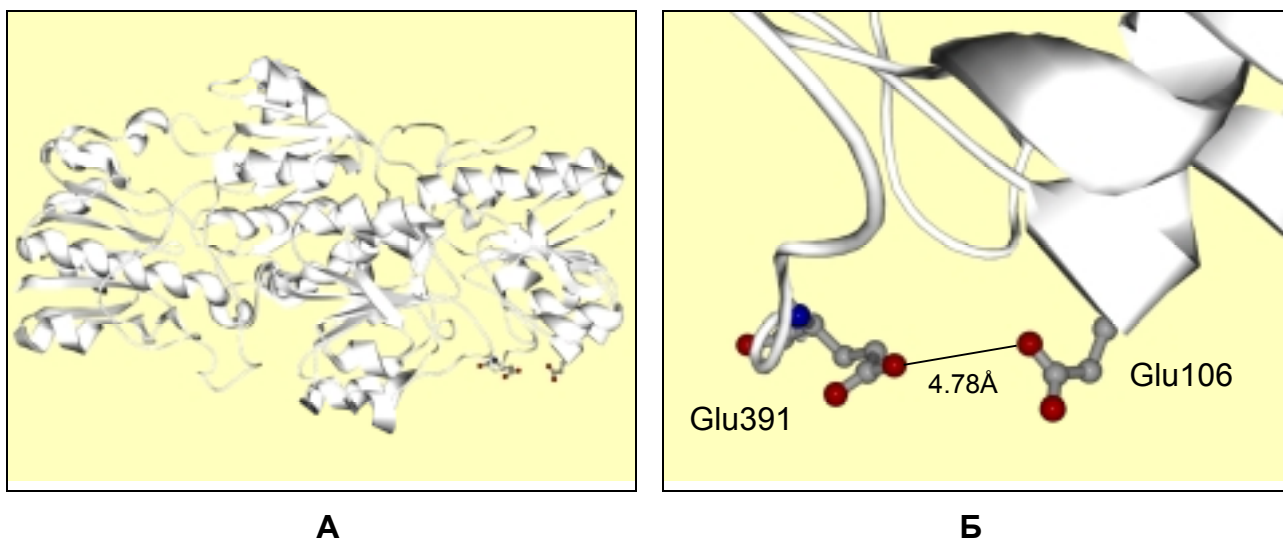


Рис. 14. Положение остатков Glu106 и Glu391 в холо-форме формиатдегидрогеназы из *Pseudomonas sp.101*. (A) и увеличенное изображение пары Glu106 - Glu391 (Å).

Остаток Glu106 находится на поверхности белковой глобулы недалеко от остатка Glu391 (рис. 14), расположенного в неструктурированной С-концевой области фермента. Для изучения роли этой пары остатков в стабильности ФДГ были получены 4 мутанта. Glu106 заменили на Arg, а Glu391 - на Gln, Lys и Arg. При заменах Glu391 на Gln и Lys полученные мутанты не отличались по своей стабильности от нативного фермента. При заменах Glu106 и Glu391 на Arg стабильность фермента увеличилась на 15% и 8%, соответственно (рис. 15).

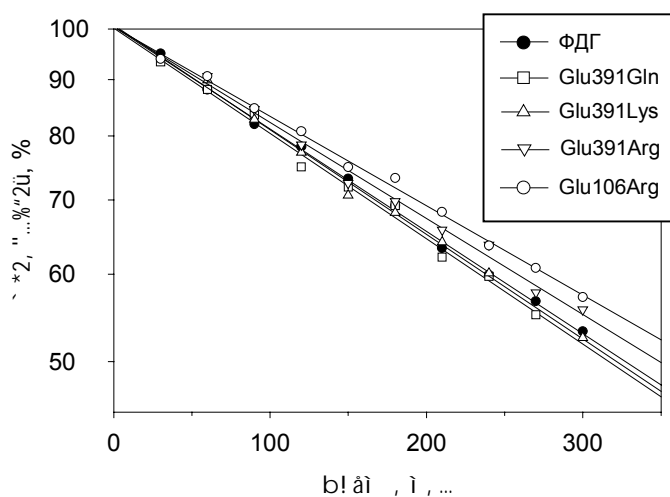


Рис. 15. Зависимость остаточной ферментативной активности от времени для формиатдегидрогеназы дикого типа и ее мутантов в положениях 106 и 391 (0,1М калий-фосфатный буфер, pH 7,0, 60 °C).

Таким образом, проведенные нами эксперименты по оптимизации электростатических взаимодействий в ФДГ из *Pseudomonas sp.101* указывают на очень большую роль этих взаимодействий в стабильности фермента. Анализ системы электростатических взаимодействий в ФДГ из *Pseudomonas sp.101* свидетельствует о высокой степени совершенства этой системы. Внесение нарушений в эту систему, как правило, приводит к снижению стабильности фермента в несколько раз. Проведенный анализ не позволил выявить “откровенно” слабые места в структура фермента,

обусловленные неоптимальными электростатическими взаимодействиями. Именно этим и можно объяснить полученные в наших экспериментах небольшие эффекты стабилизации (максимум 40%), что намного меньше эффектов стабилизации, достигнутых за счет точечных замен при оптимизации гидрофобных взаимодействий (4,3 раза).

Стабилизация формиатдегидрогеназы за счет снятия конформационных напряжений в полипептидной цепи. Одним из подходов, используемых для повышения термостабильности белков, является снятие конформационных напряжений в полипептидной цепи. Анализ карты Рамачандрана для структур как апо-, так и холо-форм ФДГ свидетельствует, что остаток Ala198 имеет исключительно неоптимальные значения углов ϕ и ψ (рис. 16). Он расположен в конце β A листа кофермент-связывающего домена. Остаток в этом положении является

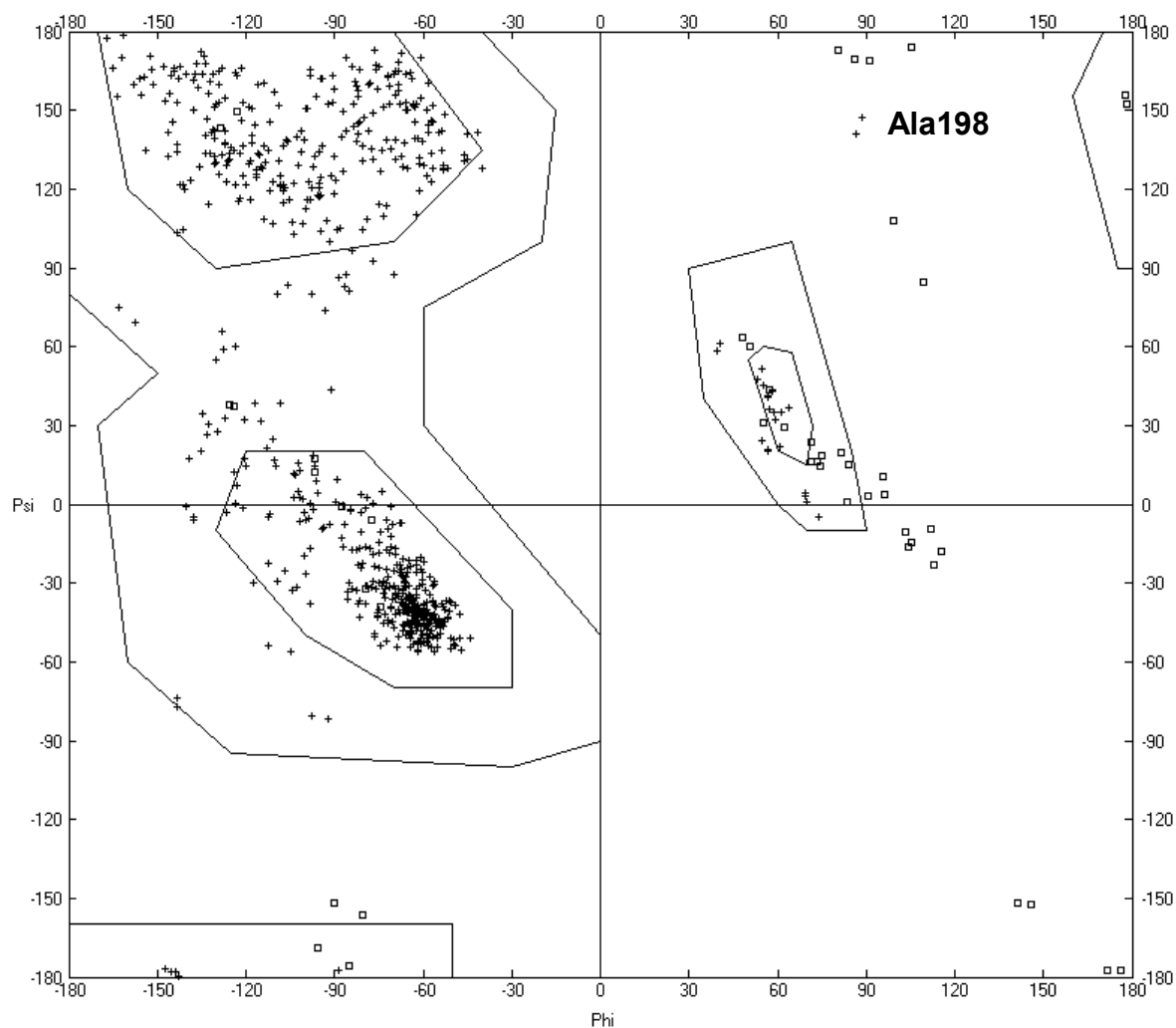


Рис. 16. Карта Рамачандрана для апо-формы формиатдегидрогеназы *Pseudomonas* sp.101. Остаток Ala198 находится в “запрещенной” области. □ - остатки глицина, + - все остальные аминокислотные остатки.

исключительно консервативным для всех NAD(P)^+ -зависимых дегидрогеназ. Это первый остаток в канонической последовательности GlyXGlyXXGly (так называемом “отпечатке” - “fingerprint”) для кофермент-связывающего домена дегидрогеназ. ФДГ из бактерий представляют собой довольно редкое исключение, когда в первом положении этой последовательности вместо остатка Gly расположен остаток Ala. Формиатдегидрогеназы из других источников (дрожжи, грибы, высшие растения, млекопитающие), а также подавляющее большинство (>99%) других NAD(P)^+ -зависимых дегидрогеназ имеют в этом положении остаток Gly.

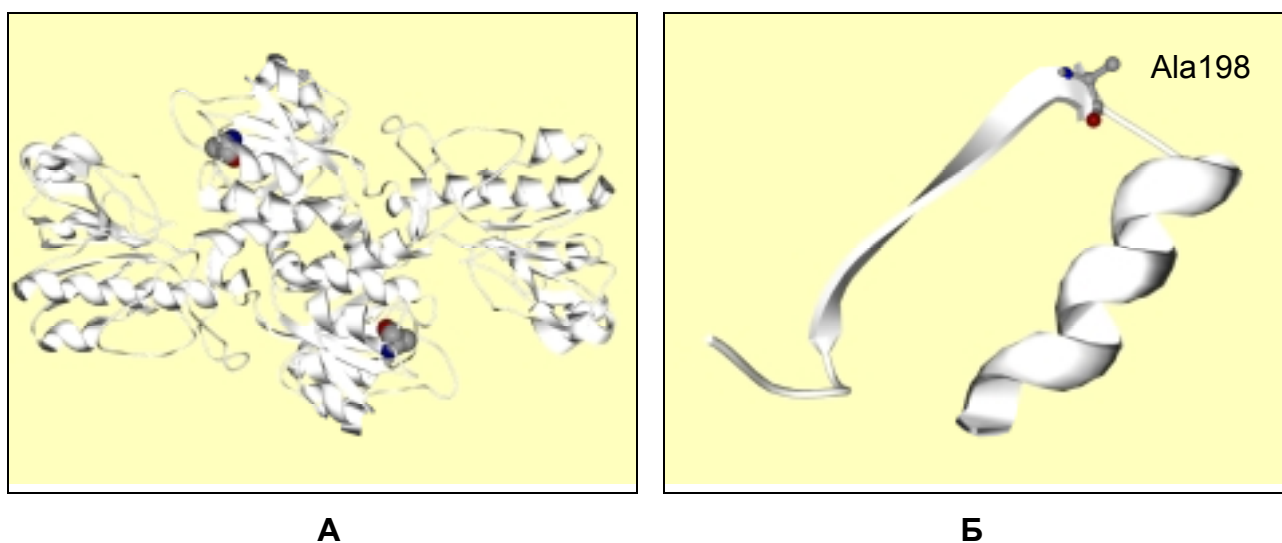


Рис. 17. Положение остатка Ala198 в апо-форме формиатдегидрогеназы из *Pseudomonas sp.101*. (A) и его увеличенное изображение (А').

Нами был получен мутант Ala198Gly и изучены его термостабильность и кинетические свойства. Оказалось, что снятие конформационных напряжений приводит к увеличению термостабильности ФДГ в 2,5 раза (рис. 18). Кроме того, оказалось, что у мутанта ФДГ Ala198Gly K_m по NAD^+ (45 μM) уменьшилась в два раза по сравнению с ферментом дикого типа (90 μM). Причина, по которой природа “ухудшила” свойства бактериальной ФДГ за счет наличия в положении 198 остатка Ala вместо “канонического” остатка Gly неясна. Проведенные в нашей лаборатории эксперименты по изучению влияния мутации Ala198Gly на свойства NADP^+ -зависимых мутантов ФДГ (А.Д.Маторин, кандидатская диссертация, Москва, МГУ, 2000) позволяют предположить, что бактериальные ФДГ являются промежуточным продуктом эволюции от NADP^+ -специфичного фермента к ферменту с абсолютной

специфичностью к NAD^+ , наблюдаемой у формиатдегидрогеназ из эукариот.

Получение многоточечного мутанта ФДГ с повышенной термостабильностью.

Как было показано выше, система электростатических взаимодействий в молекуле ФДГ играет очень большую роль в стабильности фермента. Малые эффекты стабилизации фермента, полученные в экспериментах по оптимизации этой системы, являются следствием (и одновременно свидетельством) высокого совершенства этой системы. В то же время единственная мутация Ala198Gly, направленная на оптимизацию конформации полипептидной цепи, позволила значительно улучшить как стабильность, так и сродство ФДГ к коферменту. Мутация Ala198Gly была введена в ранее полученный в нашей лаборатории мутант ФДГ Т6, содержащий шесть аминокислотных замен и превосходящий фермент дикого типа по стабильности 9 раз. Полученный в результате мутант формиатдегидрогеназы Т7 оказался в 2 и 18 раз стабильнее мутанта Т6 и фермента дикого типа, соответственно (рис. 18). Отметим высокую степень аддитивности этой мутации. Достигнутый для многоточечного мутанта Т6 эффект стабилизации за счет замены Ala198Gly (2 раза) составляет 80% от эффекта стабилизации для точечного мутанта ФДГ Ala198Gly (2,5 раза).

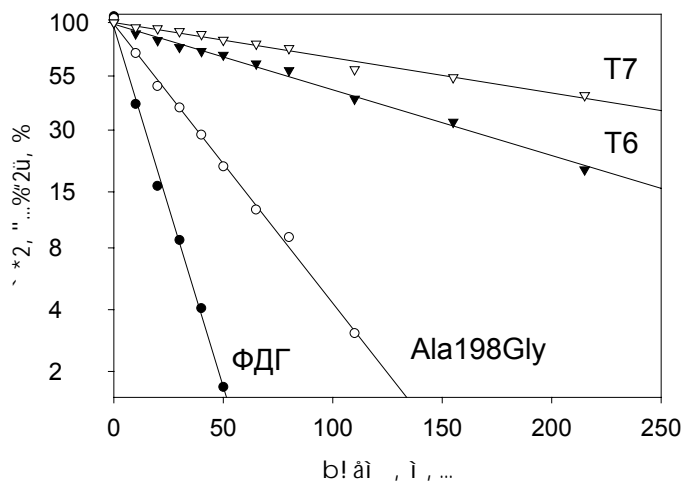


Рис. 18. Зависимость остаточной ферментативной активности от времени для формиатдегидрогеназы дикого типа и ее мутантов Ala198Gly, Т6 и Т7 (0,1М калий-фосфатный буфер, pH 7,0, 65 °С).

Разработка крупномасштабной очистки рекомбинантной ФДГ с помощью двухфазных систем.

В настоящее время на практике применяется ФДГ из дрожжей *Candida boidinii*. Как уже отмечалось выше, ФДГ из бактерий *Pseudomonas sp.101* является самым стабильным ферментом среди формиатдегидрогеназ, а также превосходит все небактериальные ФДГ по своей удельной активности. В нашей лаборатории проводятся комплексные исследования (частью которых являются и эксперименты по повышению термостабильности ФДГ) по созданию крупномасштабного процесса получения рекомбинантной ФДГ *Pseudomonas sp.101* и ее

различных мутантов. В рамках этих исследований нами также был разработан процесс крупномасштабной очистки рекомбинантной ФДГ и проведена его оптимизация путем введения стадии термообработки.

Поскольку уровень экспрессии рекомбинантной ФДГ в клетках *E.coli* составляет около 50%, то основной задачей при получении технического препарата фермента является не очистка ФДГ от примесных белков, а удаление клеточного дебриса, нуклеиновых кислот, полисахаридов и других клеточных компонентов. Кроме того, процесс должен легко масштабироваться и по возможности избегать стадий центрифугирования или фильтрования. Этим требованиям наиболее полно удовлетворяет система очистки, основанная на экстракции в водных двухфазных системах. Для создания таких систем используют водно-солевые растворы полимеров, обычно полиэтиленгликоля или декстранов с различной молекулярной массой. Нами была выбрана система на основе полиэтиленгликоля (ПЭГ). На первой стадии происходила экстракция ФДГ в верхнюю, богатую ПЭГом фазу, а клеточный дебрис и нуклеиновые кислоты уходили в нижнюю фазу. Для перевода фермента в водную фазу использовали вторую двухфазную систему, основанную на тех же компонентах. В результате получался абсолютно прозрачный раствор, содержащий препараты ФДГ не менее 50% степени чистоты, который можно было обессолить проточным диализом.

Нами была проведена оптимизация состава как первой, так и второй двухфазных систем. Было изучено влияние концентрации и молекулярной массы ПЭГ, концентрации и состава соли, а также pH среды на распределение ФДГ в верхней и нижней фазах. Оказалось, что для создания первой двухфазной системы необходимо использовать ПЭГ с молекулярной массой 1500, а pH среды должно быть не менее 8,0. Для обеспечения быстрого разделения фаз наиболее оптимально использовать смесь фосфата калия и формиата натрия. Эффективность экстракции ФДГ в верхнюю фазу составила не менее 95-97%. В случае второй системы для перевода фермента в нижнюю, водную фазу необходимо было использовать ПЭГ 20000, а pH среды понизить до 6,0-6,2. Эффективность экстракции ФДГ в водную фазу составила 90-94%. Общий выход фермента после очистки был более 75%. Наиболее критичным в этом процессе является высокая вязкость фаз в первой системе. Для их полного разделения требуется не менее 14-16 часов. Следует также отметить, что небольшая мелкодисперсная часть клеточного дебриса все же остается в

верхней фазе и ее удаление осуществляется только уже во второй двухфазной системе в виде тонкой пленки на границе раздела фаз.

Получение термостабильного мутанта формиатдегидрогеназы T7 позволило ввести в процесс очистки стадию термообработки суспензии разрушенных клеток. Известно, что многие белки *E.coli* быстро денатурируют при температуре выше 55 °С. Нами было изучено влияние температуры и времени обработки на активность и чистоту ФДГ. В случае фермента дикого типа при температуре выше 60 °С и времени инкубации более 10 мин наблюдается заметное падение активности формиатдегидрогеназы, при незначительном повышении степени чистоты. В случае мутанта ФДГ T7 температуру инкубации можно было поднимать до 65 °С. Наиболее оптимальной (по соотношению чистота/потери) оказалась температура 63 °С при времени термообработки 10-15 мин.

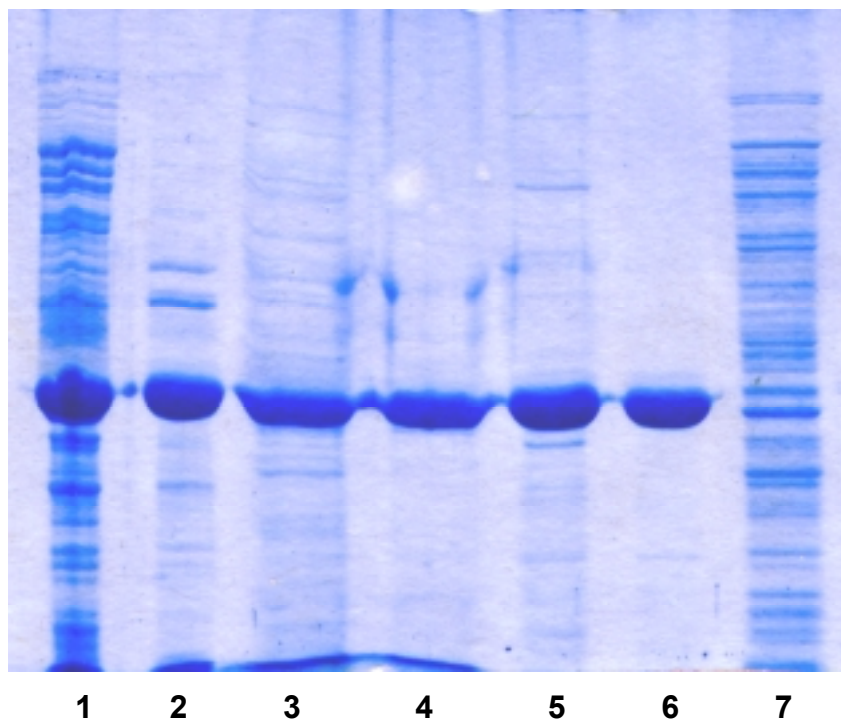


Рис. 19. SDS-электрофорез в 12% полиакриламидном геле препаратов мутанта ФДГ T7 на различных стадиях очистки. 1 и 2 - бесклеточный экстракт до и после термообработки в течение 10 мин при 63 °С, соответственно. Верхняя фаза после первой стадии очистки без (3) и с (4) предварительной термообработкой биомассы. Нижняя фаза после второй стадии очистки без (5) и с (6) предварительной термообработкой биомассы. 7 - общий растворимый белок при выращивании клеток *E.coli* без индукции биосинтеза ФДГ.

На рисунке 19 представлены результаты очистки полученного нами мутанта ФДГ T7 с помощью двухфазных систем с использованием и без использования термообработки биомассы. Как видно из этого рисунка, введение стадии термообработки позволяет получать препараты ФДГ

более чем 85% степени чистоты. Кроме того, термообработка биомассы привела к компактизации осадка и удалению его мелкодисперсной фракции. В результате уже на первой стадии происходит полное удаление клеточного дебриса из верхней фазы, а время разделения фаз сократилось примерно в два раза. Таким образом, получение высокостабильного мутанта формиатдегидрогеназы T7 позволило повысить чистоту технического препарата фермента, а также упростить процедуру очистки.

ВЫВОДЫ

1. Изучено влияние ионной силы на термостабильность бактериальной формиатдегидрогеназы. Показана важная роль электростатических взаимодействий в стабильности ФДГ из *Pseudomonas sp.101*, в отличие от фермента из *Moraxella C-2*, где главную роль в стабильности играют гидрофобные взаимодействия.
2. Показана важность ионной пары Asp43 - Lys61 для стабильности бактериальной формиатдегидрогеназы. Ее удаление приводит к 6 кратному снижению термостабильности фермента.
3. Показана возможность оптимизации структуры электростатических взаимодействий в белковой глобуле. Наибольший стабилизирующий эффект был достигнут в случае мутанта Glu170Asp который на 40% стабильнее фермента дикого типа.
4. Проведена оптимизация конформации полипептидной цепи ФДГ путем замены Ala198Gly. Достигнуто повышение термостабильности формиатдегидрогеназы в 2,5 раза и улучшение сродства фермента к NAD⁺ в 2 раза. Введение мутации Ala198Gly в полученный ранее мутант ФДГ T6 повысило термостабильность фермента по сравнению с мутантом T6 и формиатдегидрогеназой дикого типа в 2 и 18 раз, соответственно.
5. Разработана система крупномасштабной очистки формиатдегидрогеназы на основе двухфазных систем ПЭГ-соль-вода, включающая стадию термообработки, и позволяющая получать ФДГ с чистотой до 90% и выходом 75-80%.

СПИСОК РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Tishkov V.V., Fedorchuk V.V., Rojkova A.M., Savitsky A.P., Kula M.-R. Development of large scale purification of recombinant bacterial formate dehydrogenase. Abstracts of Enzyme Engineering Conference on Separation

- Technology VII "Separation for Clean Production", Davos, Switzerland, October 26-31, **1997**, p. 7.
2. **Fedorchuk V.V.**, Tishkov V.V., Kula M.-R. Downstream purification process of recombinant formate dehydrogenase from *Pseudomonas sp.101* using aqueous two-phase systems. Abstracts of International Conference "Biocatalysis-98: Fundamentals and Applications", Puschino on Oka, Russia, June 13-18, **1998**, p.32.
 3. **Fedorchuk V.V.**, Tishkov V.V. Thermostabilization of NAD⁺-dependent formate dehydrogenase from *Pseudomonas sp.101* by optimization of electrostatic interactions in protein globule. Abstracts of International Conference "Biocatalysis-98: Fundamentals and Applications", Puschino on Oka, Russia, June 13-18, **1998**, p.33.
 4. Tishkov V.I., Galkin A.G., **Fedorchuk V.V.**, Savitsky P.A., Rojkova A.M., Gieren H., Kula M.-R. Pilot scale production and isolation of recombinant NAD⁺- and NADP⁺-specific formate dehydrogenase. *Biotechnology & Bioengineering*, **1999**, v. 64, N2, p.187-193
 5. Arseev P.I., **Fedorchuk V.V.**, Tishkov V.V. Optimization of large scale purification of recombinant formate dehydrogenase in two-phase extraction systems. Abstracts of International Conference "Biocatalysis-2000: Fundamentals & Applications", Moscow, Russia, June 10-15, 2000, p.166.

