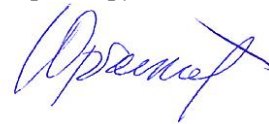


На правах рукописи



ЮРЧЕНКО Татьяна Сергеевна

**РАЦИОНАЛЬНЫЙ ДИЗАЙН ФОРМИАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ
ИЗ *Staphylococcus aureus***

1.5.4. Биохимия

1.5.6. Биотехнология

Автореферат диссертации

на соискание ученой степени кандидата химических наук

Москва 2024 г.

Работа выполнена в лаборатории молекулярной инженерии Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»

Научные руководители:

Тишков Владимир Иванович, доктор химических наук, профессор, профессор Химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Пометун Анастасия Александровна, доктор химических наук, заведующая лабораторией молекулярной инженерии Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

Официальные оппоненты:

Марквичева Елена Арнольдовна, доктор химических наук, главный научный сотрудник, зав. лаборатории биомедицинских материалов Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук» (ИБХ РАН).

Яненко Александр Степанович, доктор биологических наук, профессор, заместитель руководителя Комплекса по научной работе (Курчатовский комплекс НБИКС-природоподобных технологий) Федерального государственного бюджетного учреждения "Национальный исследовательский центр "Курчатовский институт".

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН).

Защита состоится «07» ноября 2024 г. в 14-00 часов на заседании Диссертационного совета 24.1.233.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, на соискание ученой степени кандидата наук на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, строение 2.

С диссертацией можно ознакомиться в Библиотеке биологической литературы Российской академии наук по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, строение 1 и на официальном сайте ФИЦ Биотехнологии РАН <http://www.fbras.ru>.

Автореферат разослан «___» _____ 2024 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Орловский А. Ф.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. NAD(P)⁺-зависимая формиатдегидрогеназа (ФДГ¹, КФ 1.2.1.2) катализирует реакцию окисления формиат-иона до углекислого газа с сопряженным восстановлением NAD(P)⁺ до NAD(P)H. Гены формиатдегидрогеназы обнаружены в организмах представителей царств бактерий, грибов и растений [1]. Это говорит о том, что данный фермент появился на ранних этапах эволюционного развития живых организмов и играет значимую физиологическую роль в их жизнедеятельности. При воздействии неблагоприятных факторов окружающей среды показан рост количества мРНК и активности ФДГ у растений, бактерий, в частности – в биопленках *Staphylococcus aureus* [2]. Помимо этого, наблюдается рост экспрессии генов ферментов, ответственных за наработку формиата (пируватформиат-лиаза). Таким образом, клетки *S. aureus* в биопленках получают энергию преимущественно по формиатному пути.

S. aureus – это анаэробные грам-положительные бактерии из семейства *Staphylococcae*. Данный патоген является возбудителем заболеваний, протекающих с различной степенью тяжести: как опасные для жизни, так и протекающие бессимптомно. Сложность борьбы обусловлена широким спектром факторов вирулентности и быстро распространяющейся устойчивости к новым антибактериальным препаратам. Так как формиатдегидрогеназа – один из ключевых ферментов метаболизма *S. aureus* в состоянии биопленок, его можно рассматривать в качестве перспективной мишени для подбора конкурентных ингибиторов.

На данный момент применение формиатдегидрогеназы в качестве катализатора регенерации никотинамидных кофакторов NAD(P)H в ферментативных системах стало традиционным [3-6].

Согласно требованиям FDA (Food and Drug Administration, управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов), для успешного выхода на фармацевтический рынок оптическая чистота лекарственного препарата должна составлять не менее 99%. Разделение смесей энантиомеров, присутствующих в лекарственной форме при стандартных химических способах органического синтеза, является трудоемким процессом. Использование ферментативной стадии в органическом синтезе оптически активных соединений помогает решить проблему получения энантиомерно чистого вещества. Большой интерес для технических процессов представляют NAD(P)⁺-зависимые оксидоредуктазы. Однако из-за высокой стоимости никотинамидных кофакторов их стехиометрическое использование экономически нецелесообразно. Вследствие этого, требуется эффективная регенерация кофакторов *in situ*. Наиболее перспективными стратегиями являются ферментативные способы регенерации никотинамидных кофакторов, так как их отличает высокая селективность и скорость реакции. Формиатдегидрогеназа выгодно выделяется среди других дегидрогеназ, так как основным субстратом является коммерчески доступный формиат, а продуктом реакции – диоксид углерода, не требующий дополнительных стадий очистки. Это существенно упрощает технологические процессы и позволяет избежать избыточных потерь целевого соединения.

Ген, кодирующий формиатдегидрогеназу из бактерий *S. aureus* (SauФДГ), был клонирован в нашей лаборатории несколько лет назад. SauФДГ имеет уникальную аминокислотную последовательность по сравнению с другими ФДГ. Ранее было показано, что SauФДГ имеет самую высокую k_{cat} среди описанных формиатдегидрогеназ, однако значения $K_M^{NAD^+}$, $K_M^{HCOO^-}$ также высоки [5]. Данный фермент обладает одной из самых высоких показателей термостабильности, по сравнению с ФДГ из других источников, исследованных на данный момент и сравнима по этому параметру только с ФДГ из бактерий *Pseudomonas sp. 101*. Также для этого фермента проведена кристаллизация и решена трехмерная структура (PDB: 6TTB) (PDB DOI: 10.2210/pdb6TTB/pdb) [6].

¹ В настоящей работе приняты следующие сокращения: ФДГ – формиатдегидрогеназа, SauФДГ – формиатдегидрогеназа из бактерий *Staphylococcus aureus*, CboФДГ – формиатдегидрогеназа из дрожжей *Candida boidinii*, PseФДГ – формиатдегидрогеназа из бактерий *Pseudomonas sp. 101*, SoyФДГ – формиатдегидрогеназа из сои *Glycine max*, NAD(P)⁺ – окисленная форма никотинамидадениндинуклеотида(фосфата), NAD(P)H – восстановленная форма никотинамидадениндинуклеотида(фосфата).

Таким образом, изучение формиадегидрогеназ с уникальной последовательностью имеет, как практический интерес, так как среди данных ферментов могут быть обнаружены перспективные востребованные на данный момент биокатализаторы и охарактеризованы условия их работы, так и научный – исследование взаимосвязи структура-функция методом рационального дизайна и выявление перспективных стратегий направленного мутагенеза.

Степень разработанности темы. ФДГ – достаточно подробно изученный фермент: ежегодно выпускаются новые публикации с 90-х годов XX века, для некоторых ферментов решены структуры методом рентген-структурного анализа. В течение последних трех лет описаны не изученные ранее формиадегидрогеназы из новых источников.

Работы посвящены исследованию NAD^+ -зависимых формиадегидрогеназ из различных источников методом рационального дизайна. Большая часть этих данных была получена сотрудниками нашей лаборатории. За это время были определены каталитически значимые высококонсервативные последовательности в первичной структуре формиадегидрогеназы, описаны успешные эксперименты по увеличению температурной стабильности и изменению коферментной специфичности. Однако в научной литературе представлено ограниченное количество свидетельств успешного увеличения каталитической эффективности формиадегидрогеназы посредством снижения констант Михаэлиса методом рационального дизайна.

Цели и задачи исследования. Целью данной работы является изучение взаимосвязи структура-функция рекомбинантной формиадегидрогеназы из патогенных бактерий *S. aureus*.

Задачи:

- 1) Исследование влияния N-концевой последовательности на уровень экспрессии и каталитические свойства SauФДГ при использовании клеток *E. coli* BL21 (DE3) Codon Plus/pLysS в качестве штамма-продуцента;
- 2) Исследование влияния состава и концентрации компонентов буферных систем на каталитические свойства SauФДГ;
- 3) Белковая инженерия рекомбинантной SauФДГ с целью снижения констант Михаэлиса по NAD^+ методом сайт-направленного мутагенеза;
- 4) Получение высоко изотопно-меченных ^2H , ^{15}N , ^{13}C образцов SauФДГ для поиска сайтов связывания потенциальных ингибиторов ФДГ методом ЯМР.

Объекты и методы исследования. Направленный мутагенез с введением точечной замены в ген формиадегидрогеназы из бактерий *S. aureus* осуществляли с помощью полимеразной цепной реакции. Рекомбинантные белки нарабатывали в *E. coli* BL21 (DE3) Codon Plus/pLysS. Очистку проводили с использованием дробной преципитации сульфатом аммония, гидрофобной хроматографии с последующим обессоливанием по принципу гель-фильтрации. Эффективность очистки определяли при помощи электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях. Идентификацию аминокислотной последовательности проводили с помощью тандемной MALDI TOF/TOF спектрометрии (ЦКП ФИЦ Биотехнологии РАН). Значения констант Михаэлиса и каталитические константы определяли спектрофотометрически по поглощению накапливаемого NADH и NADPH . Значения константы скорости термоинактивации определяли как тангенс угла наклона прямой на графике зависимости натурального логарифма величины остаточной активности от времени инкубации методом линейной регрессии. Активационные параметры ΔH^\ddagger и ΔS^\ddagger определяли графическим методом из температурной зависимости константы скорости термоинактивации $\ln(k_{\text{ин}}/T) - 1/T$, на основании уравнения теории активированного комплекса. Моделирование структур мутантных форм и фермента дикого типа проводили при помощи онлайн-сервера AlphaFold2, ColabFold.

Научная новизна. Изучено влияние N-концевой аминокислотной последовательности на уровень экспрессии и свойства SauФДГ. Впервые получена форма белка SauФДГ, содержащая полную аминокислотную последовательность. В рамках данного исследования была разработана комбинированная буферная система, приводящая к снижению константы Михаэлиса по NAD^+ и увеличению каталитической константы SauФДГ. Выделено и охарактеризовано 25 новых

мутантных форм формиатдегидрогеназы из *S. aureus* с использованием рационального дизайна, включающие замены в 17 каталитически значимых положениях. Показаны изменения в каталитических свойствах после введения выбранных замен, что подтверждает значимость данных положений для катализа. Для двух мутантных форм показано снижение константы Михаэлиса по NAD^+ вследствие введения меньших по объему боковых заместителей. Проведен дизайн С-концевой области SauФДГ и показано ее критическое значение в катализе.

Теоретическая и практическая значимость работы. На примере рекомбинантной формиатдегидрогеназы из *S. aureus* была продемонстрирована значимость пост-трансляционной модификации отщеплением части N-концевой аминокислотной последовательности. Было показано, что только укороченная форма белка проявляет специфическую активность. Данный факт может быть полезен при исследовании дегидрогеназ из семейства стафилококковые.

Данные, полученные при изучении влияния структура-функция формиатдегидрогеназы из *S. aureus*, являются вкладом в систематическое исследование формиатдегидрогеназ из различных источников. На примере данного фермента были подтверждены или опровергнуты успешно используемые ранее приемы рационального дизайна. А также, проведена апробация новых стратегических подходов.

Разработанная буферная система может быть использована как при исследовании зависимости каталитических свойств ферментов от pH, так и на практике: поставляться совместно с коммерческими системами ферментативной регенерации никотинамидных кофакторов. Мутантные формы с улучшенными каталитическими свойствами могут быть использованы в качестве компонента ферментативных систем с регенерацией NADH.

Полученные в ходе работы высоко изотопно-меченые образцы формиатдегидрогеназы из *S. aureus* могут быть использованы для поиска перспективных ингибиторов SauФДГ как потенциальной мишени для борьбы с данным патогеном.

Методология и методы исследования. В рамках данной работы были использованы следующие методы и подходы: биоинформатика (конструирование праймеров), методы генетической инженерии (полимеразная цепная реакция, рестрикция, лигирование), микробиологические методы и методы молекулярной биологии (трансформация, культивирование и экспрессия в клетках *E. coli*), хроматографические методы (гидрофобная хроматография, гель-фильтрация), аналитические методы изучения физико-химических свойств ферментов (спектрофотометрия).

Вклад автора в проведенное исследование. Большинство экспериментов, вошедших в диссертацию, было выполнено либо непосредственно Юрченко Татьяной Сергеевной, либо с её участием под руководством д.х.н. Пометун Анастасии Александровны и д.х.н., проф. Тишкова Владимира Ивановича. Автор самостоятельно изучил актуальные литературные данные и на их основании составил обзор литературы. Соискатель совместно с руководителями определил цели и задачи исследования, самостоятельно составил план работ, проводил исследования и анализ полученных результатов. Автором была проведена значительная работа над текстом опубликованных статей.

Положения, выносимые на защиту.

1. В результате экспрессии как полноразмерного гена *Saufdh1*, так и укороченного *Saufdh2* конечный каталитически активный продукт имеет одну и ту же аминокислотную последовательность. Это связано с протеолизом по остатку метионина в 34 положении в процессе пост-трансляционной модификации.

2. Использование четырехкомпонентного буферного раствора 0,1 М NaPB-Cit-Tris-Gly приводит к снижению константы Михаэлиса по NAD^+ в 1,5 раза по сравнению с со значением $K_M^{\text{NAD}^+}$ в 0,1 М натрий-фосфатном буферном растворе за счет синергетического влияния органических компонентов, а также приводит к увеличению термостабильности.

3. Замена V119A приводит к снижению $K_M^{\text{NAD}^+}$ и $K_M^{\text{HCOO}^-}$ в 2,5 и 1,6 раз соответственно по сравнению с ферментом дикого типа. Введение замены F194V привело к снижению констант

Михаэлиса по NAD^+ и формиату в 4 и 2 раза соответственно при незначительном снижении k_{cat} . С-концевой участок первичной последовательности играет ключевую роль в катализе SauФДГ.

4. Разработанная методика позволяет получить образцы SauФДГ, содержащие изотопные метки ^2H , ^{13}C , ^{15}N с высоким выходом по экспрессии. Содержание меток достаточно для дальнейших исследований и максимально возможно в условиях научно-исследовательской лаборатории.

Степень достоверности и апробация работы. Достоверность результатов, полученных в ходе данной работы, подтверждается воспроизводимостью произведенных измерений и согласованностью результатов, полученных с использованием комбинации различных методов, адекватных поставленным задачам. Основные результаты работы были представлены на международных конгрессах и конференциях: XXVIII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов 2021" (Москва, Россия, 2021), III Объединенный научный форум физиологов, биохимиков и молекулярных биологов VII съезд биохимиков России X Российский симпозиум «Белки и Пептиды» VII съезд физиологов СНГ (Дагомыс, Россия, 2021), XXVII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов 2020" (Москва, Россия, 2020), Юбилейная V Междисциплинарная конференция «Молекулярные и биологические аспекты химии, фармацевтики и фармакологии» (МОБИ-ХимФарма2019) (Судак, Крым, Россия, 2019), The 44th FEBS Congress (Краков, Польша, 2019), XXVI Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов 2019» (Москва, Россия, IX International congress «Biotechnology: state of the art and perspectives» (Москва, Россия, 2017), VIII Московский международный конгресс «Биотехнология: Состояние и перспективы развития» (Москва, Россия, 2015).

Публикации. По материалам работы опубликовано 5 статей в международных журналах (индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus) и 11 тезисов докладов международных и всероссийских конференций.

Структура и объем работы. Диссертационная работа состоит из шести глав: общей характеристики работы, обзора литературы, материалов и методов, обсуждения результатов, заключения и списка литературы. Материал работы изложен на 128 страницах, содержит 27 таблиц, 41 рисунок и 120 ссылок.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Изучение влияния N-концевой последовательности на уровень экспрессии и свойства рекомбинантной SauФДГ

Аннотация генома *S. aureus* предполагает существование гена ФДГ в двух вариантах, начинающихся с разных остатков метионина (рис. 1). Согласно проведенным исследованиям MALDI TOF спектрометрии получаемая в результате экспрессии полноразмерного гена *Saufdh1* формиатдегидрогеназа идентична по структуре, экспрессируемому из укороченного гена *Saufdh2*. Помимо этого, было показано, что оба выделенных белка обладают идентичными каталитическими свойствами и показателями температурной стабильности. Значения k_{cat} для SauФДГ1 составили 20 с^{-1} , $K_M^{\text{NAD}^+}$ - 220 μM ; $K_M^{\text{HCOO}^-}$ - 130 мМ. Значения термодинамических параметров составили 500 ± 20 кДж моль для этальпии и 1180 ± 80 Дж/(моль·К).

```
SauФДГ_1      1  MSNGAVFFVIFLKQATCNTYFKEVKIYHNLGEMDMKIVALFPPEAVEGQ-ENQLLN-TK
SauФДГ_2      1  -----MKIVALFPPEAVEGQ-ENQLLN-TK
```

Рис. 1. Фрагмент N-концевой аминокислотной последовательности SauФДГ1 и SauФДГ2.

Выход целевого белка при экспрессии *Saufdh2* превышает данный показатель для удлиненного гена *Saufdh1* (рис. 3А, дорожки 1 – 4) примерно в два раза. Это может указывать на пост-трансляционную модификацию в 33-35 положениях. Помимо этого, в гене ФДГ присутствует нуклеотидная последовательность, выделенная на рисунке рамкой, схожая с последовательностью RBS (рибосом-связывающий сайт) в векторе рЕТ24а(+), выделенная на рис. 2 серым цветом.

		RBS фара T7		1 2		22
SauФДГ 1	DNA:	tttaag AAGGAG atatacatatggctagcatg TCA aacggtgcc // ttt AAG gaagtcaaaa				
	enz:			·M·S·N·G·A·	//	·F·K·E·V·K·
SauФДГ noRBS1	DNA:	tttaag-----atatacatatggctagcatg tc aaacggtgcc // tttaaggaagtcaaaa	делеция			
	enz:			·M·S·N·G·A·	//	·F·K·E·V·K·

Рис. 2. Фрагмент последовательности гена *Saufdh1*.

Было сделано предположение, что при экспрессии удлиненной формы гена, рибосома могла ошибочно связываться с аналогичной последовательностью в гене и, таким образом, получается укороченная форма гена. Для того чтобы проверить данное предположение произвели делецию сайта RBS в векторе (noRBS1).

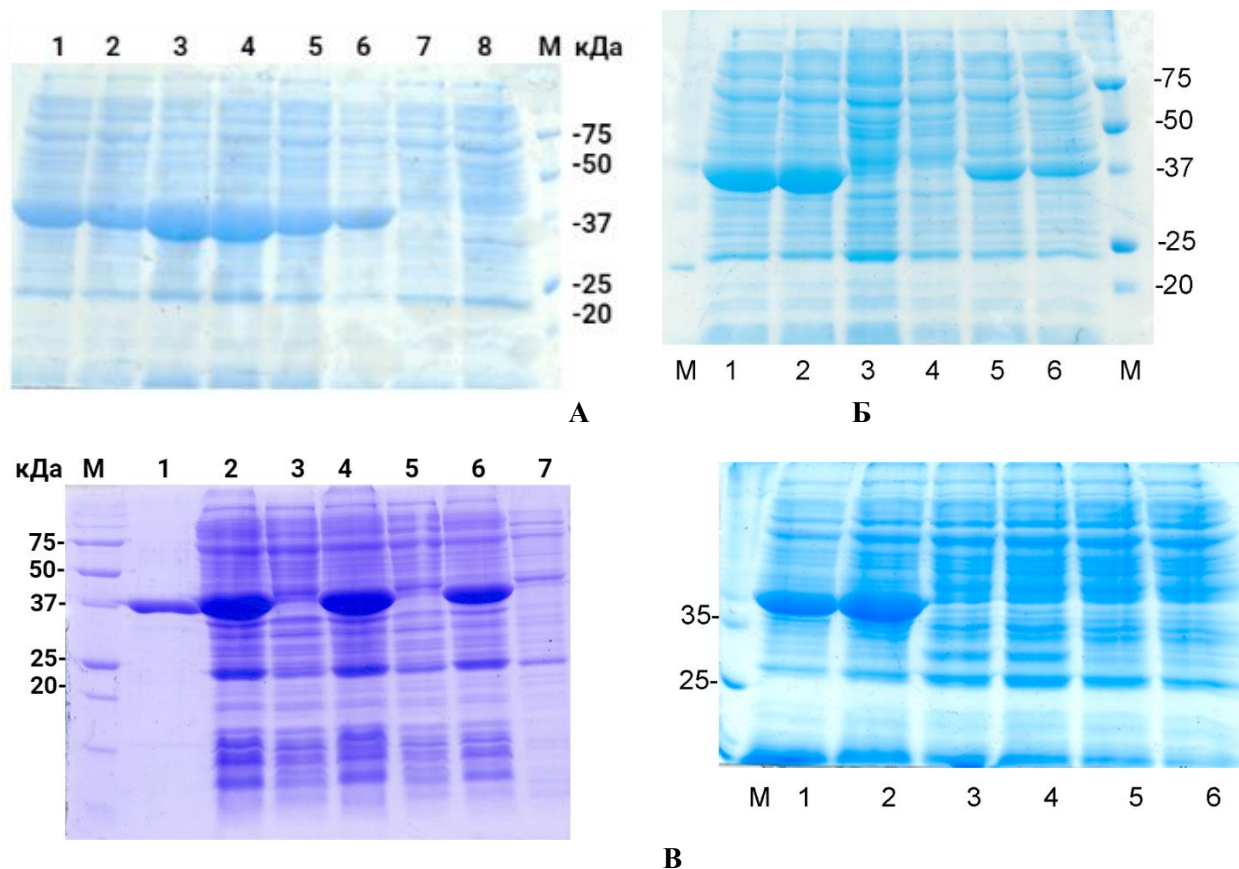


Рис. 3. (А) Экспрессия SauФДГ1 и SauФДГ2, где М – маркер молекулярной массы, кДа, 1,2 – SauФДГ1, 3,4 – SauФДГ2, 5,6 – SauФДГ S2, 7,8 – SauФДГ M34A; (Б) 1,2 – SauФДГ1, 3,4 – SauФДГ M34G+K35Q, 5,6 – SauФДГ K35A; (В) Экспрессия мутантных форм, содержащих замену в 34 положении, где М – маркер молекулярной массы, кДа, 1 – SauФДГ2, 2,3 – SauФДГ M34A клеточный лизат с нерастворимой фракцией, только растворимая фракция соответственно, 4,5 – D33N+M34A клеточный лизат с нерастворимой фракцией, растворимая фракция, 6,7 – M34G+K35Q клеточный лизат с нерастворимой фракцией, растворимая фракция; (Г) 1,2 – SauФДГ1; 3,4 – SauФДГ D33N+M34A; 5,6 – SauФДГ noRBS1.

При экспрессии мутантной формы с заменой K35A получается укороченный вариант белка (Рис.3Б, дорожки 5-6). На рисунке 3В представлен электрофорез клеточных лизатов мутантных форм с заменами по 34 положению: M34A; D33N+M34A; M34G+K35Q. Примечательно, что полоса целевого белка визуализируется только в нерастворимой фракции. В данных образцах было подтверждено присутствие первых 33 аминокислотных остатков с помощью MALDI TOF спектрометрии. Следовательно, при экспрессии мутантных форм, содержащих замену в 34 положении, получается полноразмерный вариант белка.

В случае делеции RBS в векторе pET24a(+) (рис. 3Г, дорожки 5 – 6) экспрессии целевого продукта не наблюдается. Таким образом, было опровергнуто предположение, что экспрессия начинается в области ложного RBS. Таким образом, основной причиной, по которой получается белок идентичный как по структуре, так и по свойствам, является, предположительно, пост-трансляционная модификация по 34 остатку метионина.

Исследование влияния состава и концентрации компонентов буферных систем на каталитические свойства SauФДГ

Отличительной особенностью SauФДГ является самая высокая каталитическая константа среди описанных формиатдегидрогеназ. Однако несмотря на это, а также выдающиеся показатели термостабильности, высокое значение константы Михаэлиса по дорогостоящему никотинамидному кофактору (NAD⁺) ограничивает использование этого фермента в качестве компонента ферментативных систем в синтезе оптически активных соединений. Фосфатный буфер является стандартным при определении каталитических параметров формиатдегидрогеназ из различных источников. На его основе при добавлении наиболее часто используемых органических компонентов Gly², цитрата и Tris получили двух-, трех- и четырехкомпонентные буферные системы. В таблице 1 представлены значения каталитических констант и констант Михаэлиса по NAD⁺ ($K_M^{NAD^+}$) для wt SauФДГ (здесь и далее фермент соответствует белку, полученному при экспрессии *Saufdh1*), полученные при pH 7,0 и 30°C.

Таблица 1

Каталитические параметры рекомбинантной wt SauФДГ в различных буферных системах, (pH 7,0, 30°C).

Буферный раствор	k_{cat}, c^{-1}	$K_M^{NAD^+}, \mu M$
0,05 M NaPB	15	223±15
0,1 M NaPB	20	220±17
0,4 M NaPB	21	300±50
0,1 M NaPB+0,5 M Gly	20	604±72
0,1 M NaPB+0,5 M Tris	18	397±50
0,1 M NaPB-Tris-Cit	15	242±23
0,1 M NaPB-Tris-Gly	20	194±13
0,1 M NaPB+0,25M Tris-Gly	20	225±15
0,1 M NaPB-Cit-Gly	16	332±29
0,025 M NaPB-Cit-Tris-Gly	14	285±30
0,05 M NaPB-Cit-Tris-Gly	34	210±20
0,1 M NaPB-Cit-Tris-Gly	27	143±6

*Среднее значение из трех экспериментов. Ошибка определения не более 10%

² Gly – глицин, Cit – цитрат, Tris - трис(гидроксиэтил)аминометан, NaPB - натрий-фосфатный буфер.

В случае 0,1 М NaPB-Cit-Tris-Gly показано снижение константы Михаэлиса по NAD⁺ в 1,5 раза без дополнительного воздействия на белковую глобулу. Наименее подходящим буфером является 0,1 М NaPB+0,5 М Gly. Значение $K_M^{NAD^+}$ возросло в 3 раза.

Помимо этого, исследовали температурную стабильность в 0,1 М NaPB-Cit-Tris-Gly при pH 7,0 и 64°C. Показано снижение константы скорости термоинактивации. Это может быть связано с увеличением концентрации зараженных ионов в растворе.

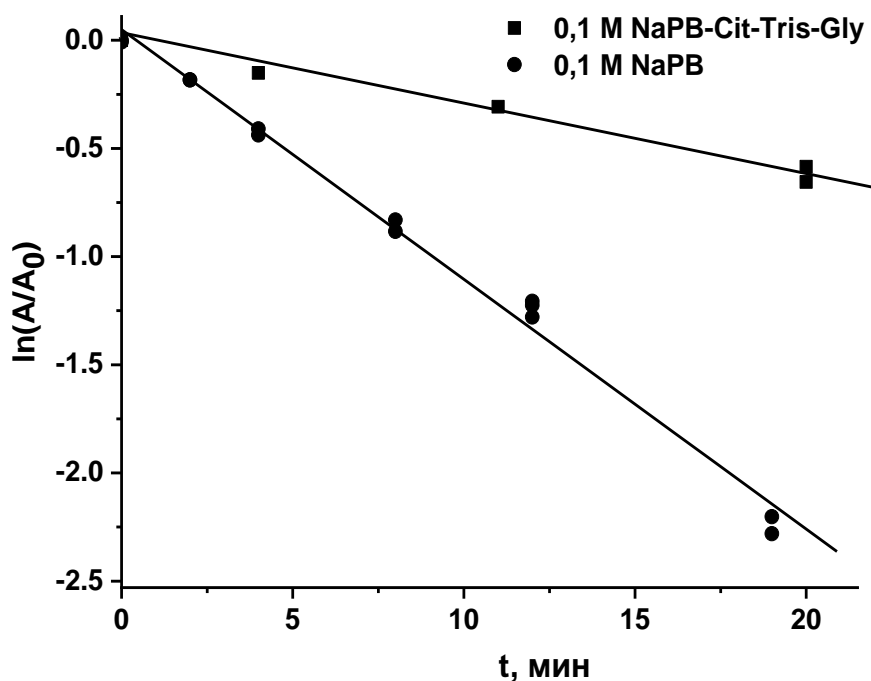


Рис. 4. Зависимость остаточной активности от времени инкубации в полулогарифмических координатах для фермента дикого типа в 0,1 М натрий-фосфатном и 0,1 М NaPB-Cit-Tris-Gly буферных растворах, pH 7,0, 64°C.

Белковая инженерия формиатдегидрогеназы из *S. aureus*

Влияние консервативного мотива X₁G(A)X₂GRX₃G на свойства фермента

Консервативный мотив X₁G(A)X₂GRX₃G характерен для широкого круга дегидрогеназ, имеющих специфичность к никотинамидным кофакторам. В случае стафилококковых формиатдегидрогеназ, данный мотив содержит нехарактерные для бактериальных ферментов аминокислотные остатки (Рис.5).

Провели замену Пе в положении 193 на наиболее часто встречающийся практически для всех известных на сегодняшний день ФДГ остаток Thr. По аналогичному принципу были определены замены в X₁ остатка Phe194 на Val и в X₂ остатка Phe196 на Ala чтобы приблизить этот мотив к канонической последовательности. Мы также решили ввести двойные замены: Пе193Thr+Phe194Val и Phe194Val+Phe196Ala, чтобы изучить синергетический эффект этих мутаций. Свойства данных мутантных форм представлены в таблице 2.

Введение более гидрофильного и менее объемного аминокислотного остатка треонина в положение 193 привело к увеличению K_M и практически не повлияло на каталитическую константу SauФДГ. Вероятно, введение полярной OH-группы Thr вместо CH₃-CH₂ части Пе193 негативно влияет на гидрофобные взаимодействия этого остатка с неполярными боковыми радикалами Пе191, F194, Ala204, находящимися рядом с этим остатком (193) в коферментсвязывающем домене.

193 194 196

PseФДГ	HEWARKGGWNIADCVSHAYDLEAMHVG TVAAG RIGLAVLRRLAPFDVH-LHYTDRHRLPES
SauФДГ	HRQSVEGEWNLSQVGNHAHELQHKTI GIFGFG RIGQLVAERLAPFNVTLQHY-DPIN----
SsiФДГ	HRQSEEGGWNLTVTNHAFELQNKTI GIFGLG RIGRLVGERLKPFNVDIIHY-RRSS----
SsaФДГ	HRQSYDGEWHLSKVGEGAHDIQHKKIG IFGYG QIGELVAQRIQPFVDVQVQHF-RRSS----
SeqФДГ	HRQSYNGEWNLSKVGNAHDLQHKKIG IFGYG QIGELVAERLQPFVDVKVQHY-RRSS----
BstФДГ	HAIAQQGGWNIADCVSRSYDVEGMHFG TVGAG RIGLAVLRRLKPFGLH-LHYTQRHRLDAA
BpeФДГ	YQCVLDGGWNIADCVARSYDLEGMQV--- GAG RIGSAVLRRLKPFVDVQ-LHYTDQHRLPAA
GmaФДГ	HKIAEEGGWNIADCVSRSYDLEGMHVG TVAAG RIGLAVLRRLKPFVDK-LHYTARHRSPRA
LpnФДГ	YNTVIDGGWNIADCVSRSYDLEGMQVG CVAAG RIGLAVLRRLKPFVAVK-LHYTDRHRLPLH
MorФДГ	HDWARNGGWNIADCVARSYDVEGMHVG TVAAG RIGLRVLRLLAPFDMH-LHYTDRHRLPEA

Рис. 5. Участок выравнивания аминокислотных последовательностей ФДГ из различных источников с выделенным консервативным мотивом G(A)XGXXG, где PseФДГ – *Pseudomonas* sp.101 (P33160), SauФДГ – *Staphylococcus aureus* (A0A266CVV8), SsiФДГ – *Staphylococcus simulans* (A0A418J355), SsaФДГ – *Staphylococcus saprophyticus* (A0A4Y9KMF1), SeqФДГ – *Staphylococcus equorum* (A0A7T9NCC7), BstФДГ – *Burkholderia stabilis* (B5A8W5), BpeФДГ – *Bordetella pertussis* (A0A171JVB9), GmaФДГ – *Granulicella mallensis* (G8NVB5), LpnФДГ – *Legionella pneumophila* (A0A3A6W2S5), MorФДГ – *Moraxella* sp. (O08375). Сверху отмечены номера значимых для SauФДГ остатков.

Замена F194V привела к снижению константы Михаэлиса по NAD^+ и формиат-аниону в 3,9 и 1,9 раза соответственно по сравнению с wt-SauФДГ. k_{cat} несколько снижается – в 1,25 раза. Причина этого эффекта, вероятно, заключается в том, что Val в положении 194 может устранять стерические затруднения в активном центре, которые могут быть вызваны более близкими гидрофобными аминокислотами F194, Phe233, Ile245, Leu256, Phe257 (рис. 6А).

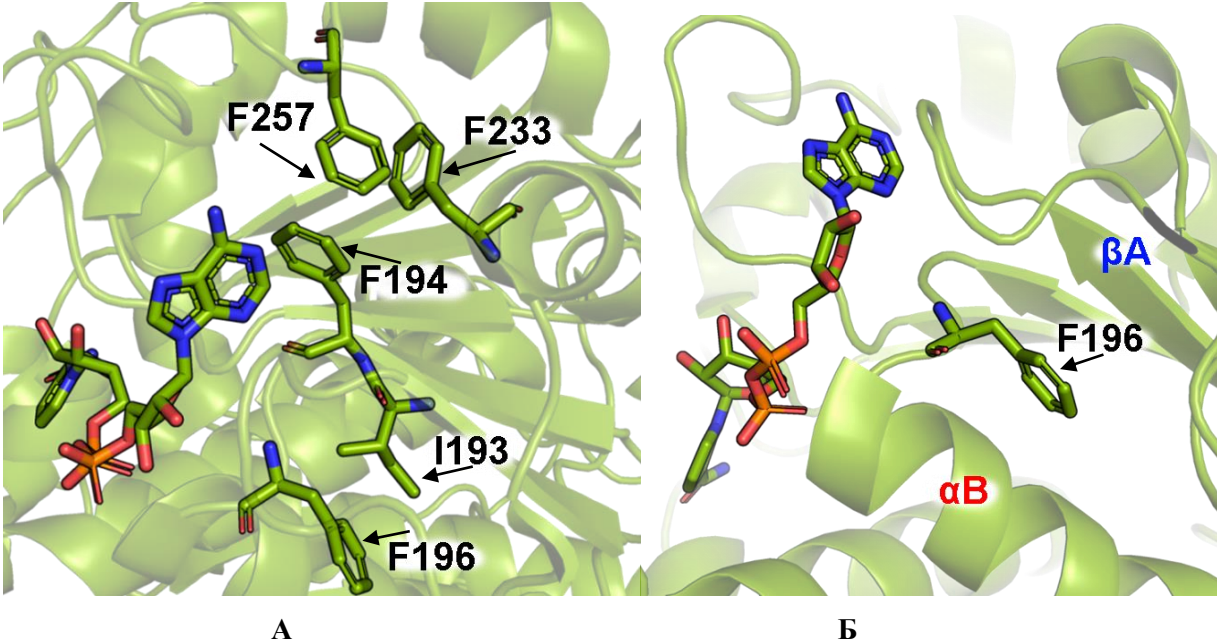


Рис. 6. (А) Фрагмент структуры (PDB: 6TTB) центра в области консервативного мотива G(A)X₁GX₂X₃G. Выделены остатки I193, F194, F196, F233, F257; (Б) Область остатка F196 с обозначенными элементами вторичной структуры.

Таблица 2

Каталитические параметры мутантных форм SauФДГ и фермента дикого типа.

Ферменты	k_{cat} , с ⁻¹	$K_M^{NAD^+}$, μ М	$K_M^{HCOO^-}$, мМ	ΔH^\ddagger , кДж/моль	ΔS^\ddagger , Дж/(моль·К)
SoyФДГ	2,9	13,3	1,5	н/д	н/д
CboФДГ	3,7	45	5,9	н/д	н/д
PseФДГ	7,3	65	6,5	н/д	н/д
wt SauФДГ	20,0±1,0	220±10	130±10	430±20	1010±60
V119I	12,0±0,5	310±10	104±4	440±20	1050±50
V119A	22±2	89±5	75±6	515±20	1230±60
V119G	3,2±0,2	8,1±0,4	3,0±0,2	н/д	н/д
I193T	20±1	463±38	107±9	550±10	1370±20
F194V	16,0±0,7	57±3	67±7	530±20	1300±60
*F194V	17,0±0,5	31±2	50±3	н/д	н/д
F196A	10,0±0,8	1300±50	156±6	545±30	1350±90
I193T+F194V	19±1	78±4	116±11	495±15	1185±50
F194V+F196A	20,2±1,5	460±20	52±3	520±20	1275±60
Y217T	11,2±0,9	210±20	68±7	520±20	1280±50
D218Q	11±0,7	3166±130	160±10	н/д	н/д
P219R	16,1±1,1	670±60	100±6	575±30	1450±100
H246N	18,6±0,6	425±13	75±5	580±30	1200±100

*Каталитические свойства SauФДГ F194V, измеренные в 0,1 М NaPB-Cit-Tris-Gly при pH 7,0 и 30°C.

Для двойной мутантной формы I193T+F194V константа Михаэлиса по NAD^+ в 2,8 раза ниже, чем у фермента дикого типа, и может быть объяснена мутацией 194, эффект которой, вероятно, сильнее, чем у мутации в положении 193. У двойного мутанта F194V+F196V также наблюдается синергетический эффект. Однако введение замены в 196 положении в этом случае по-прежнему приводит к снижению каталитической активности, поскольку F196 располагается на стыке двух элементов вторичных структур α -спирали и β -листа и может играть важную роль в структурной организации.

Для SauФДГ Phe194Val определены каталитические параметры в комбинированном 0,1 М NaPB-Cit-Tris-Gly буферном растворе. Показано снижение константы Михаэлиса по NAD^+ , что сопоставимо с результатами для фермента дикого типа.

Изучение X₁DX₂, ответственного за коферментную специфичность

Остаток Asp218 играет ключевую роль в коферментной специфичности. Общей же чертой $NADP^+$ -зависимых ФДГ, которых в литературе описано не так много, является присутствие остатка Gln в структурно-эквивалентном положении. Ранее в литературе была показана успешная замена коферментной специфичности на примере формиатдегидрогеназ из *Pseudomonas sp.* 101, *C. Boidinii* путем введения замены остатка аспарагина на глутамин. Для качественной оценки перспективности получения $NADP^+$ -специфичности была проведена замена Asp218 на Gln. На рисунке 7 показан фрагмент выравнивания аминокислотных последовательностей формиатдегидрогеназ из различных источников в области остатка Asp218 (нумерация для SauФДГ).

	217 218 219
PseФДГ	HEWARKGGWNIADCVSHAYDLEAMHVGTVAAAGRI GLAVLRRLAPFDVH-LHY TDR HRLPES
SauФДГ	HRQSVGEWNLQVGNHAHELQHKTI GIGFGFRIGQLVAERLAPFNVTLQH Y-DP IN----
SsiФДГ	HRQSEEGWNLQVTNHA FELQNKTI GIGFGLGRIGRLVGERLKP FNVDI IH Y-RR SS----
SsaФДГ	HRQSYDGEWHLSKVG EHAHDIQHKKIGIFGYGQIGELVAQRLQPF DVQVQH F-RR SS----
SeqФДГ	HRQSYNGEWNLSKVG NHAHDLQHKKI GIGFGYGQIGELVAERLQPF DVKVQH Y-RR SS----
BstФДГ	HAIAQQGGWNIADCVSR SYDVEGMHFGTVGAGRI GLAVLRRLKPFGLH-LHY TQR HRLDAA
BpeФДГ	YQCVLDGGWNIADCVAR SYDLEGMQV---GAGRI GSAVLRRLKPF DVG-LHY TDQ HRLPAA
GmaФДГ	HKIAEEGGWNIADCVSR SYDLEGMHVGTVAAAGRI GLAVLRRLKPF DVK-LHY TAR HRSPPA
LpnФДГ	YNTVIDGGWNIADCVSR SYDLEGMQVGCVAAGRI GLAVLRRLKPF AVK-LHY TDR HRLPLH
MorФДГ	HDWARNGGWNIADCVAR SYDVEGMHVGTVAAAGRI GLRVLRL LAPFDMH-LHY TDR HRLPEA

Рис. 7. Выравнивание аминокислотных последовательностей формиатдегидрогеназ из разных источников.

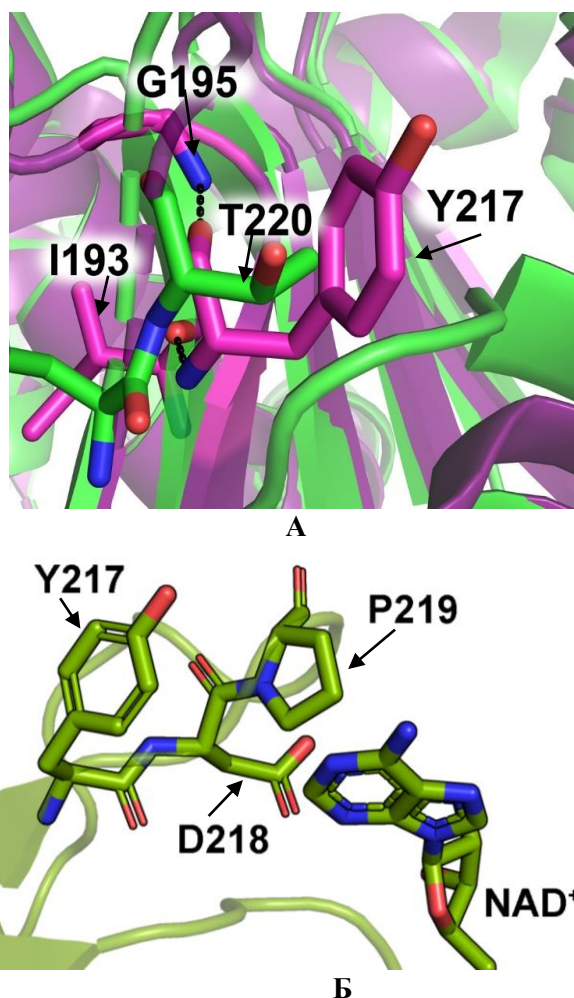


Рис. 8. (А) Наложение структуры PseФДГ (2NAD) (зеленый) и SauФДГ (6TTB) (фиолетовый), RMSD 1,21 Å. (Б) Остатки Y217, D218 и P219 располагаются на поверхности субстратного канала.

Также было проведено исследование роли ближайших к Asp218 аминокислотных остатков в положениях 217 и 219 в связывании коферментов и катализе. Для представителей семейства стафилококков непосредственно перед остатком Asp218 присутствует делеция, однако, для других представителей царства бактерии в данной области располагается остаток треонина. Однако, при наложении структур PseФДГ (PDB 2NAD) и SauФДГ (PDB 6TTB), видно, что остаток Thr220 PseФДГ

и Tyr217 в SauФДГ пространственно близки (рис.8А). Остаток Pro219 уникален для *S. aureus*. В большинстве других источников в данном структурно-эквивалентном положении располагается остаток аргинина. Моделирование взаимодействий остатков Tyr217 и Pro219 с аминокислотным окружением показано на рис. 8Б.

Замена на остаток глутамина в 218 положении привела к резкому ухудшению каталитических свойств по отношению к NAD⁺. Также, в присутствии NADP⁺ в диапазоне концентраций 0,025 – 10 мМ активность не была обнаружена. В то же время, замена D/Q в ФДГ из других источников приводила к успешному изменению специфичности кофермента. Это можно объяснить низким уровнем гомологии SauФДГ.

Замена Tyr217Thr способствовала снижению константы Михаэлиса по формиату примерно в 2 раза. Причина, вероятно, в меньшем объеме Thr217 по сравнению с Tyr. Значение k_{cat} при этом стало в 2 раза ниже. При этом мы можем наблюдать небольшое улучшение термостабильности по сравнению с wt-SauФДГ. Замена остатка Pro219 на Arg привела к 3х-кратному увеличению $K_M^{NAD^+}$. Таким образом, основной вывод заключается в том, что объемные остатки Tyr и Pro, располагающиеся с обеих сторон от значимого Asp218 создают необходимую жесткость цепи и фиксируют данное положение относительно молекулы кофермента.

Изучение структуры активного центра методом направленного мутагенеза

В первую очередь, был проанализирован остаток V119, который располагается в каталитическом домене и участвует в пространственной ориентации формиат-аниона и находится на дне субстратного канала.

Согласно выравниванию аминокислотных последовательностей, представленном на рисунке 9, для эукариотических дрожжей и растений, а также, прокариотических стафилококков наиболее характерен остаток Val. Тогда как для большинства представителей царства бактерии в данном положении располагается остаток Ile.

119

PseФДГ	AKAKNLKLALTAG I GSDHVDLQSAIDRNVTVAEVTYCNSISVAEHVMMILSLVRNYLPS
SauФДГ	EKAPNLKLAITAG V GSDHVDLAAASEHNIGVVEVTGSNTVSVAEHAVMDLLILLRNYEEG
SsiФДГ	EQAPNLKLAITAG V GSDHVDLEAASEHDISVVEVTDSNTVSVAEHIVMTTLILVRNYEEG
SsaФДГ	NKAENLKLAITAG V GSDHVDLEAASENELTVIEVTGCNTVSVAEHTVMDLLILMRNFMEG
SeqФДГ	RKASQLKLAITAG V GSDHIDLNAASQNDLTVLEVTGCNTISVAEHTVMDVLIILLRNFMEG
BstФДГ	ARAPKLRLALTAG I GSDHVDLDAAARAHITVAEVTGSNSISVAEHVMTTLALVRNYLPS
BpeФДГ	AKAPRLKLAITAG I GSDHVDLQAAAQHGLTVAEVTYSNSISVSEHVMMLALVRNYLPS
GmaФДГ	AKAKKLKLALTAG I GSDHVDLNAAIKAGITVAEETFSNGICVAEHAVMMILALVRNYLPS
LpnФДГ	ESAPKLKLAITAG I GSDHVDLQAAMEHNITVCEVTYCNSISVAEHTVMMILALVRDFIPQ
MorФДГ	AKAPKLKLALTAG I GSDHVDLQAAIDNNITVAEVTYCNSNSVAEHVMMVLGLVRNYIPS

Рис. 9. Выравнивание аминокислотных последовательностей формиатдегидрогеназ из разных источников.

В то же время, ожидается, что его замена на менее объемные остатки Ala и Gly может привести к увеличению объема полости субстратного канала с последующим изменением структуры активного центра. На рисунке 10 представлен фрагмент структуры SauФДГ в области остатка Val119.

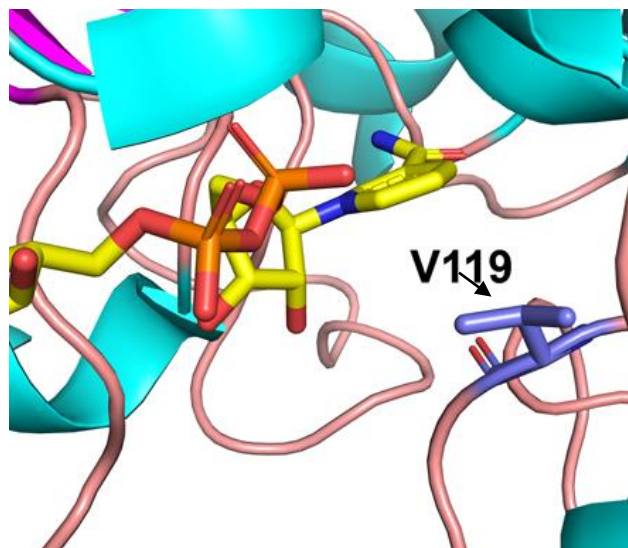


Рис. 10. Фрагмент структуры SauФДГ в области остатка V119.

В целом, в ряду 119Ple-Val-Ala-Gly наблюдается последовательное снижение констант Михаэлиса как для кофермента, так и для субстрата. Замена V119I приводит к увеличению $K_M^{\text{NAD}^+}$ и снижению k_{cat} . В то же время замены Val119 на Ala и Gly имеют обратный эффект. В случае V119G это выражено наиболее заметно: $K_M^{\text{NAD}^+}$ и $K_M^{\text{HCOO}^-}$ снизились в 27,5 раз и в 23,6 раза соответственно по сравнению с wt-SauФДГ. Однако при этом k_{cat} снизилась в 6,25 раза. Для SauФДГ наиболее перспективной заменой является V119A. В результате этой мутации обе K_M снижаются, и в то же время k_{cat} остается неизменным. Исследование температурной стабильности показало, что введение замен V119I и V119A привело к снижению температурной стабильности примерно в 3 раза по сравнению с ферментом дикого типа.

На основании выравнивания аминокислотных последовательностей (рис. 11.) провели замену His246 на более консервативный остаток Asn.

	246
PseФДГ	VEKELNLTWHATREDMPVCDVVTL N CPLHPETEHEMINDETLKLFKRGAYIVNTARGKLC
SauФДГ	-QQDHKLSKFVVSFDELVSTSDA I TI H APLTPETDNLFDKDVLSRMKKHSYLVNTARGKIV
SsiФДГ	-QEDTDFSKYVNFDELVHKSDVLI I TTPLTPETDDLFDYNTISQMKDGSYIVNCARGKIV
SsaФДГ	-QЭДТАYSKYVNFDELVSTSDALV I LSPLTKETDDLFDYDVLSRMKQGSYLVNTARGKIV
SeqФДГ	-QENTPYSKYVDFDELVSTSDVI V LSPLTSETDDLFDYDVLSRMKEGSYLVNTARGKIV
BstФДГ	IEQELGLTYHADPASLAAAVDIVNL Q IPLYPSTEHLFDAAMIARMKRGAYLINTARAKLV
BpeФДГ	TEQELGARYHPDAAALAGACDVI S LCPLHPGTEHLFDAAMLARMKRGAYLINTARGKIC
GmaФДГ	IEDELGLTYHATAEEMAЕVCDVI S I H APLYPATEHLFNAKVLNKMRRHGSYLVNTARAEIC
LpnФДГ	LEQELNLTYNHPSVESMVKVCDVVS I H CPLHPETEYLFDDRLIKQMKRGSYLINTARGKIC
MorФДГ	VEKELNLTWHATREDMYGACDVVTL N CPLHPETEHEMINDETLKLFKRGAYLVNTARGKLC

Рис. 11. Фрагмент выравнивания аминокислотных последовательностей.

Предполагается, что данная замена позволит выявить роль гидрофобных взаимодействий имидазольного кольца, водородных связей с ближайшим окружением, в частности с молекулой кофермента и важным остатком Phe194 (рис. 12).

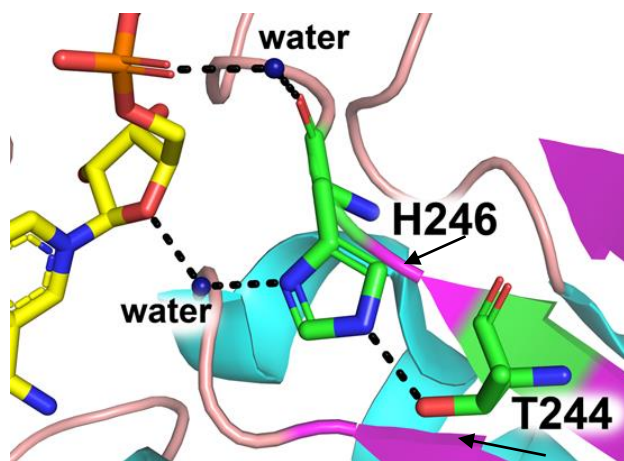


Рис. 12. Фрагмент структуры SauФДГ (код PDB: 6TTB) с отмеченными аминокислотными остатками H246 и T244. α -Спирали выделены синим цветом, β -листы – пурпурным, петли – светло-розовым. NAD⁺ окрашен элементами: С – желтый, N – синий, O – красный, P – оранжевый.

Введение замены H246N привело к увеличению значения константы Михаэлиса по NAD⁺ примерно в 2 раза, тогда как константа Михаэлиса по формиату снизилась до 75 мМ по сравнению с ферментом дикого типа. Причина, вероятно, заключается в частичной потере водородных связей и гидрофобных взаимодействий вследствие введения Asn. Более высокое сродство к формиату, вероятно, можно объяснить большим пространством в каталитическом домене фермента в результате мутации.

Белковая инженерия С-концевой последовательности формиатдегидрогеназ

С-концевая область ФДГ из семейства стафилококков в целом короче, чем у других бактериальных ФДГ на 3 – 17 аминокислотных остатков так же, как и в случае эукариотических ферментов (Рис. 13). Помимо этого, в большинстве бактериальных формиатдегидрогеназ в этой области располагается каталитически значимый остаток гистидина, тогда как у прокариотических стафилококков и эукариотических дрожжей – остаток лизина. Помимо этого, показана делеция из трех аминокислот перед остатком лизина. Анализ структур описанных ФДГ показал, данная область важна для образования полноценного активного центра фермента.

	368
LleФДГ	GVREILECWF DGK -PIREDYLIVHN GR LAGV GS H SH SYSKGNSTKGV EQQLDLV ---
LegФДГ	GVREILECWLGNK-PIREEYLIVSQHLAGV GS H SH SY SAGNTT SGTEQAAELV---
PseФДГ	GTREILECFF EGR -PIRDEYLIVQGGALAGTGAH SH SYSKGNATGGSEEA AKFKKAV
BbrФДГ	GTREILECWLDGR-AIRTEYLIVDQGRLAGAGAHAYTPGD TTAGS EDAARFHP--
BpeФДГ	GTREILECWLDGR-AIRTEYLIVDQGRLAGAGAHAYTPGD TTAGS ENAARFHP--
VceФДГ	GTLEILQCWF DGK -PIRNEYLIVDGGTLAGTGAQ SYRLT -----
BstФДГ	GTLEILQCWF DGR -PIRNEYLIVDGGTLAGTGAQ SYRLT -----
SoyФДГ	GVKDM LD RHF KGE -DFPEQNYIVKEGQLASQYR-----
AthФДГ	GTKDM L ERYF KGE -DFPTENYIVKDGELAPQYR-----
PpaФДГ	GTKDMIDRWL KHE -AFPEQNYIVREGK LASQYL -----
CboФДГ	GTKNILESFFT GKFDYR PQDIILLNGEYVT---KAYGKHKDKK-----
OpaФДГ	GTKNILESFFT QKFDYR PQDIILLNGKYKT---KSYG-ADK-----
SceФДГ	GVKNILNSYF SKKFDYR PQDIIVQNGSYAT---RAYG-QKK-----
SauФДГ_1	GVKDIL ERFFNHE -PFQDKDIIVASGRIAS---KSYTAK-----
SauФДГ_2	GVKDIL ERFFNHE -PFQDKDIIVASGRIAS---KSYTAK-----
SsaФДГ	GVKDILTR FFNHE -PFQDKDIIVDAGKISS---KSYTAK-----

Рис. 13. Фрагмент выравнивания аминокислотных последовательностей в С-концевой области.

Однако, в экспериментальной структуре PDB: 6TTB фрагмент RIASKSYTAK не визуализируется вследствие высокой подвижности основной цепи в данной области. Поэтому для приблизительной оценки пространственного расположения значимых остатков использовали расчетную структуру, с использованием открытого онлайн сервера AlphaFold2 – ColabFold. Анализ данной структуры показал, что С-концевые аминокислотные остатки SauФДГ K368, S369 и Y370 значительно удалены от активного центра и не участвуют в связывании кофермента (таблица 3). Тогда как в случае PseФДГ остатки гистидина в положениях 224, 259 и 380 активно вовлечены в формирование активного центра: остаток H258 образует водородную связь с молекулой NAD⁺; H380 и H224 могут взаимодействовать друг с другом по принципу стэкинг-взаимодействия; S381 и Y382 образуют водородные связи с NAD⁺ напрямую и через молекулу воды соответственно (рис. 14 А,Б). Предположительно, введение недостающих аминокислотных остатков TGA и AGA, как наиболее часто встречающихся в бактериальных формиатдегидрогеназах могло бы привести к изменениям в конформации.

Таким образом, было предложено ввести в SauФДГ точечные замены I220H, T250H, K336H, получить тройной мутант с заменами I220H+TGA+K368H, а также получить ферменты с различными комбинациями замен: TGA+K368H, AGA+K368H, I220H+T250H+TGA+K368H, I220H+TGA+K368H.

Таблица 3

Взаимодействия, ответственные за связывание кофермента и формирование оптимальной конформации активного центра.

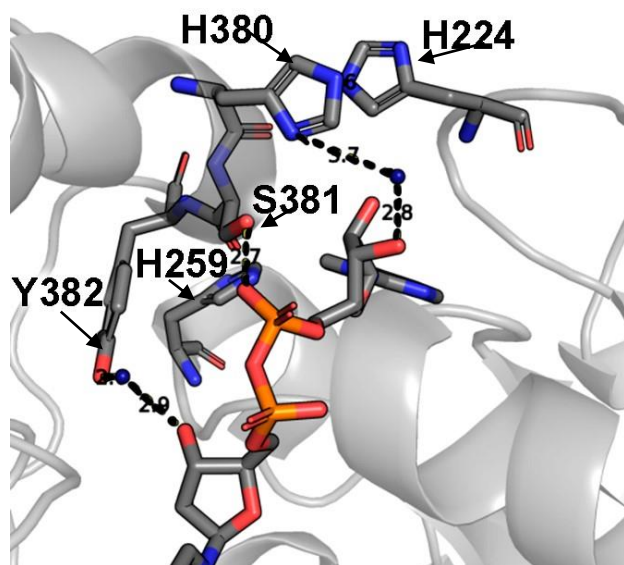
Эквивалентные остатки	<i>Pseudomonas sp.101</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Тип взаимодействия</i>
	H224	H380	I220	-	Стекинг
	H380	H ₂ O	K368	-	Водородная связь
	H259	NAD ⁺	T250	NAD ⁺	Водородная связь
	S381	NAD ⁺	S369	-	Водородная связь
	Y382	H ₂ O	Y370	-	Водородная связь

На рис. 14Б показан результат наложения модельной структуры SauФДГ с PseФДГ с изображенными структурно эквивалентными положениями, которые также представлены в таблице 3. Наличие водородной связи между остатком T250 SauФДГ и молекулой NAD⁺ предположительно сохраняется (таблица 3, рис. 14Б) как и у структурно-эквивалентного положения H259 PseФДГ. Однако в другом структурно-эквивалентном положении (H224 PseФДГ) наличие в SauФДГ остатка I220 вместо остатка гистидина исключает образование стэкинг-взаимодействия с введенным H368 вместо остатка лизина. Поэтому было предложено провести замену I220H как в качестве индивидуальной замены, так и совместно с заменой K368H. В таблице 4 представлены значения каталитических параметров. Введение данных замен привело к ухудшению каталитических свойств.

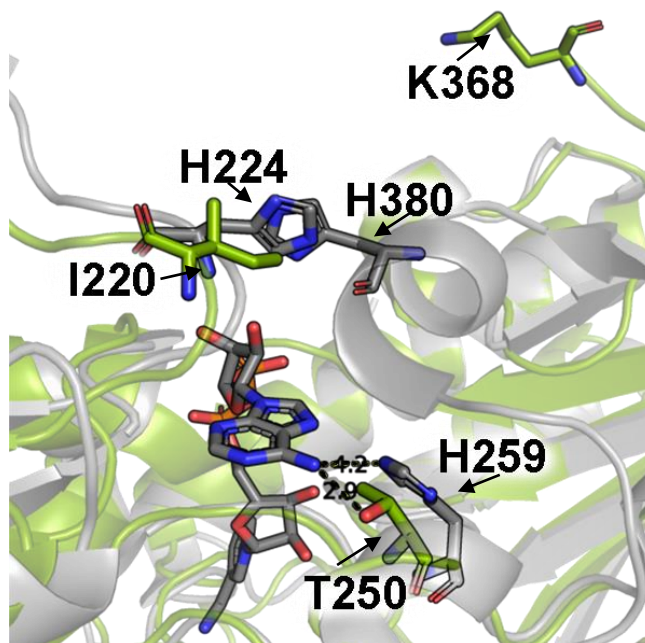
Таблица 4

Каталитические свойства мутантных форм SauФДГ и фермента дикого типа.

Фермент	k_{cat} , с ⁻¹	$K_m^{NAD^+}$, μМ	$K_m^{HCOO^-}$, мМ	ΔH^\ddagger , кДж/моль	ΔS^\ddagger , Дж/(моль·К)
wt-SauФДГ	20	220±7	130 ± 10	430±20	1010±60
I220H	21	330±20	150±10	450±20	1040±50
T250H	13	540±50	100±10	590±30	1450±100
K368H	6	280±20	105±10	650±50	1630±150
TGA+K368H	4	3360±200	420±50	580±30	1415±100
AGA+K368H	4	3300±300	230±20	580±20	1410±100
I220H+TGA+K368H	4	4978±600	185±20	580±20	1410±80
I220H+T250H+TGA+K368H	4	3350±200	300±50	560±20	1420±90



A



Б

Рис. 14. (А) Компьютерное моделирование структуры С-концевой части ФДГ из *Pseudomonas sp.*101 (PDB:2NAD); (Б) Наложение структур PseФДГ (PDB:2NAD) и модельной структуры SauФДГ, отмеченных серым и зеленым цветом соответственно.

Получение высоко изотопно-меченых образцов SauФДГ для поиска сайтов связывания потенциальных ингибиторов методом ЯМР

Формиатдегидрогеназа из бактерий *S. aureus* можно рассматривать в качестве перспективной мишени для разработки лекарственных препаратов на основе конкурентных ингибиторов. Данный подход основан на разработке химических соединений, способных достаточно прочно связываться с мишенью и приводить к изменению конформации, блокированию каталитической активности. Одним из основных экспериментальных методов, используемых в области рационального дизайна лекарств, является ядерно-магнитный резонанс (ЯМР). Для отслеживания связывания потенциальных ингибиторов в отдельных участках молекулы выполняется отнесение сигналов, полученных в спектрах: 2D-спектр HSQC (SauФДГ ^1H , ^{15}N , ^{13}C и SauФДГ ^2H , ^{15}N , ^{13}C), 3D-спектры HNCO, HN(CO)CA, CBCA(CO)NH, HN(CA)CO, HNCA, HNCACB (SauФДГ ^2H , ^{15}N , ^{13}C)

Получение изотопно-меченых препаратов ферментов сопряжено с увеличением времени, стоимости одного культивирования, также с определенными трудностями роста клеточных культур в присутствии высокого содержания дейтерия. Соответственно в рамках данной работы поставлена задача оптимизировать процесс культивирования и экспрессии ФДГ для достижения наибольшего выхода целевого белка с литра среды. Результаты экспрессии представлены в таблице 5. MALDI масс-спектры пептидов после триптического гидролиза образцов SauФДГ ^2H , ^{15}N , ^{13}C и SauФДГ ^2H , ^{15}N , ^{13}C показали равномерное распределение указанных изотопов в молекуле белка со степенью обогащения не менее 95% по ^2H и не менее 98% по ^{13}C и ^{15}N . Данный уровень обогащения изотопами является максимально достижимым в условиях научно-исследовательской лаборатории и полностью достаточен для проведения ЯМР-экспериментов.

На рис. 15А показаны измеренные параметры релаксации ядер ^{15}N , а также вычисленные по ним параметры порядка S^2 для SauФДГ. Можно увидеть, что подвижность цепи в апо-форме повышена в области 41-44, 73-79, 108-111, 186, 219-222, 264-267, 351-353, 355-360 аминокислотных остатков (нумерация соответствует структуре 6ТТВ). Данные аминокислотные остатки значительно удалены от активного центра и не влияют на связывание молекулы кофермента за исключением аминокислотных остатков в 219 – 222, располагающихся в окружении значимого остатка D218 и 364 – 369 положениях, соответствующих С-концевой области. Это полностью согласуется с результатом РСА. Остальные каталитически значимые области характеризуются высокой степенью упорядоченности. На рис. 15Б показано расположение α -спиралей и β -листов SauФДГ в соответствии с аминокислотной последовательностью согласно данным ЯМР.

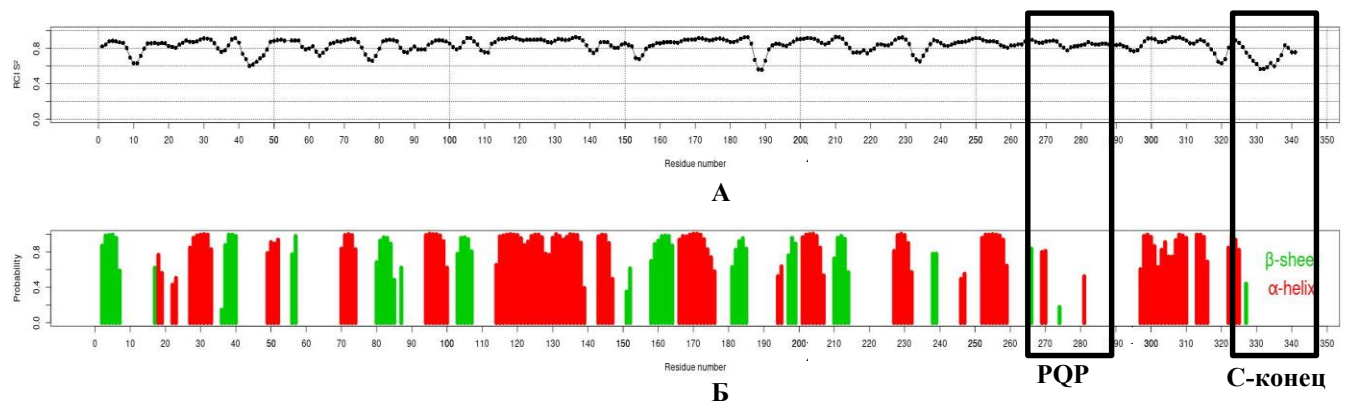


Рис. 15. (А) Предсказание параметра порядка; (Б) Данные об элементах вторичной структуры SauФДГ в апо-форме, полученные методом ЯМР.

Таблица 5

Основные показатели экспрессии SauФДГ2 в различных условиях с использованием изотопно-меченных источников ^2H , ^{15}N , ^{13}C . Образцы, выделенные серым, были использованы для снятия спектров.

Основные параметры культивирования SauФДГ2	Выход фермента с литра среды, ед	Масса клеток в литре среды, г	Содержание фермента в клетках, ед/г	получаемый препарат
M9/10% ISOGROW ^1H , ^{15}N , 1мМ IPTG, 20°C, 210 об/мин	13135	6	2189	SauФДГ ^1H , ^{15}N , ^{12}C
M9/25% ISOGROW ^1H, ^{15}N 1мМ IPTG, 20°C, 210 об/мин	22138	15,6	1419	SauФДГ ^1H, ^{15}N, ^{12}C
M9/50% ISOGROW ^1H , ^{15}N 1мМ IPTG, 20°C, 210 об/мин	16074	15,2	1057	SauФДГ ^1H , ^{15}N , ^{12}C
M9 в 100% D ₂ O и 100% ^2H -глицерин/25% ISOGROW ^2H , ^{15}N в 100% D ₂ O, 1мМ IPTG, 20°C, 250 об/мин	13280	11	1206	SauФДГ ^2H , ^{15}N , ^{12}C
M9 в 50% D₂O и 100% ^2H-глицерин/25% ISOGROW ^2H, ^{15}N в 50% D₂O, 1мМ IPTG, 20°C, 250 об/мин	20403	17	1200	SauФДГ ^2H, ^{15}N, ^{12}C
M9 в 50% D₂O и 100% ^2H, ^{13}C-глюкоза/25% ISOGROW ^2H, ^{15}N, ^{13}C в 50% D₂O, 1мМ IPTG, 20°C, 250 об/мин	22318	20	1116	SauФДГ ^2H, ^{15}N, ^{13}C

ВЫВОДЫ

1. Получаемая в результате экспрессии полноразмерного гена *Saufdh1* формиатдегидрогеназа идентична по структуре и каталитическим свойствам белку, экспрессируемому из укороченного гена *Saufdh2* вследствие пост-трансляционной модификации по остатку Met34.
2. Разработана эффективная четырех-компонентная буферная система, состоящая из 0,1 М NaPB-Cit-Tris-Gly, приводящая к снижению $K_M^{NAD^+}$ для wt-SauФДГ в 1,5 раза по сравнению с 0,1 М NaPB.
3. Провели рациональный дизайн каталитически значимых остатков в различных частях аминокислотной последовательности SauФДГ. Замена V119A привела к снижению значений $K_M^{NAD^+}$ и $K_M^{HCOO^-}$ в 2,5 и 1,6 раз соответственно по сравнению с ферментом дикого типа. Замена объемного остатка Phe в 194 положении на менее объемный остаток Val привела к снижению констант Михаэлиса по NAD^+ и формиату в 4 и 2 раза соответственно при незначительном снижении k_{cat} .
4. Получены высоко-изотопно меченные $^2H, ^{15}N, ^{13}C$ образцы SauФДГ, которые могут использоваться в исследовании структуры и поиска перспективных ингибиторов методом ЯМР.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в международных рецензируемых журналах

1. Pometun A.A., Boyko K.M., **Iurchenko T.S.**, Nikolaeva A.Yu, Atroshenko D.L., Savin S.S., Popov V.O., Tishkov V.I. Highly-Active Recombinant Formate Dehydrogenase from Pathogenic Bacterium *Staphylococcus aureus*: Preparation and Crystallization. // *Biochemistry (Moscow)*. – 2020. – V. 85. – № 6. – P. 689-696.
2. **Юрченко Т.С.**, Болотова С.Б., Логинова А.А., Пометун Е.В., Савин С.С., Пометун А.А., Тишков В.И. Влияние природы буферного раствора на каталитическую активность NAD^+ -зависимой формиатдегидрогеназы из бактерий *Staphylococcus aureus*. // *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия*. – 2022. – Т. 63. – № 6. – С. 405–417.
3. **Юрченко Т.С.**, Логинова А.А., Пометун Е.В., Тишков В.И., Савин С.С., Пометун А.А. Инженерия активного центра формиатдегидрогеназы из *Staphylococcus aureus*: введение в структуру дополнительной петли и остатков гистидина. // *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия*. – 2023. – Т. 64. – № 2. – С. 163–177.
4. **Юрченко Т.С.**, Пометун А.А., Атрошенко Д.Л., Чубарь Т.А., Польшаков В.И., Савин С.С., Тишков В.И. Получение изотопно меченых препаратов рекомбинантной NAD^+ -зависимой формиатдегидрогеназы из патогена *Staphylococcus aureus*. // *Биотехнология*. – 2023. – Т. 39. – № 6. – С. 19-25.
5. **Iurchenko T.S.**, Bolotova S.B., Loginova A.A., Kargov I.S., Atroshenko D.L., Savin S.S., Pometun E.V., Tishkov V.I., Pometun A.A. Study of the structure-function relationship of formate dehydrogenase– an important enzyme for *Staphylococcus aureus* biofilms by rational design. // *Biochimie*. – 2024. – Vol. 216. – P. 194-204.

Тезисы докладов

1. Тишков В.И., Савин С.С., Голубев И.В., Федорчук В.В., Каргов И.С., Зарубина С.А., Долина И.А., Атрошенко Д.Л., Захарова Г.С., Полозников А.А., **Виротайнен Т.С.**, Ковалевский Р.П., Степашкина А.В., Чубарь Т.А., Упоров И.В., Склярченко А.В., Яроцкий С.В., Алексеева А.А. Рациональный дизайн ферментов для биотехнологии. // VIII Московский международный конгресс «Биотехнология: Состояние и перспективы развития». Материалы конгресса. – 2015. – Т.2. – С. 452 – 453.

2. Тишков В.И., Пометун А.А., Зарубина С.А., Каргов И.С., **Виролайнен Т.С.**, Атрошенко Д.Л., Комарова Н.В., Голубев И.В., Хушпульян Д.М., Захарова Г.С., Чубарь Т.А., Газарян И.Г., D'Oronzo E., Facheris S., Secundo F., Савин С.С. Структурно-функциональные исследования оксидоредуктаз. // Acta Naturae (русскаяязычная версия). – 2016. – Т. 2. – С. 34 – 34.

3. Tishkov V.I., Pometun A.A., Zarubina S.A., Fedorchuk V.V., Fedorchuk E.A., Stepashkina A.V., Atroshenko D.L., Parshin P.D., **Virolainen T.S.**, Kovalevsky R.P., Chubar T.A., Boiko K., Eldarov M., Savin S.S. New paradigm in biocatalysts creation. // IX International congress «Biotechnology: state of the art and perspectives». – 2017. – P. 39 – 39.

4. Болотова С.Б., **Юрченко Т.С.**, Пометун А.А. рН-зависимость активности и термостабильность мутантной форматдегидрогеназы из бактерий *Staphylococcus aureus* с улучшенными кинетическими параметрами. // Материалы XXVI Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов 2019», секция "Химия". – 2019. – С.1030 – 1030.

5. **Yurchenko T.**, Pometun A., Boiko K., Savin S., Tishkov V. Use of site-directed mutagenesis for structure-function studies of formate dehydrogenases from the bacterium *Staphylococcus aureus*. // FEBS open bio. – 2019. – V. 9. – № 1. – P. 278 – 278.

6. Тишков В.И., Пометун А.А., Атрошенко Д.Л., Паршин П.Д., Ковалевский Р.П., Эльдаров М.А., **Юрченко Т.С.**, Бойко К.М., Хренова М.Г., Urlacher V.B., Савин С.С. “Genome mining” и белковая инженерия для создания новых биокатализаторов, биосенсоров и поиска лекарств против биопленок патогенов. // Юбилейная V Междисциплинарная конференция «Молекулярные и биологические аспекты химии, фармацевтики и фармакологии» (МОБИ-ХимФарма2019). Сборник тезисов докладов. – 2019. – С.92 – 92.

7. **Юрченко Т.С.**, Пометун А.А., Савин С.С., Тишков В.И. Структурно-функциональные исследования форматдегидрогеназы патогенных бактерий. // Юбилейная V Междисциплинарная конференция «Молекулярные и биологические аспекты химии, фармацевтики и фармакологии» (МОБИ-ХимФарма2019). Сборник тезисов докладов. – 2019. – С.250 – 250.

8. **Юрченко Т.С.**, Пометун А.А., Тишков В.И. Влияние структуры N-концевой последовательности на уровень экспрессии и свойства ФДГ из бактерий *Staphylococcus aureus*. // Материалы XXVII Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов 2020". – 2020. – С.1608 – 1608.

9. Болотова С.Б., **Юрченко Т.С.**, Пометун А.А., Тишков В.И. Белковая инженерия структуры активного центра форматдегидрогеназы из бактерий *Staphylococcus aureus*. // Материалы XXVIII Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов 2021". – 2021. – С. 1144 – 1144.

10. **Юрченко Т.С.**, Пометун А.А., Романов Р.С., Манцызов А.Б., Польшаков В.И., Тишков В.И. Получение изотопно-меченных образцов форматдегидрогеназы из бактерий *Staphylococcus aureus* для исследования структуры фермента методом ЯМР. // Материалы XXVIII Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов 2021". – 2021. – С.1214 – 1214.

11. Пометун А.А., **Юрченко Т.С.**, Болотова С.Б., Логинова А.А., Пометун Е.В., Савин С.С., Тишков В.И. Исследование уникальных структурно-функциональных особенностей форматдегидрогеназы из патогенных бактерий методом сайт-направленного мутагенеза. // III Объединенный научный форум физиологов, биохимиков и молекулярных биологов VII съезд биохимиков России X Российский симпозиум «Белки и Пептиды» VII съезд физиологов СНГ. Научные труды. – 2021. – Т.2. – С.69 – 69.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tishkov V.I., Popov V.O. Catalytic Mechanism and Application of Formate Dehydrogenase // Biochemistry(Moscow). – 2004. – Vol. 69. – № 11. – P. 1252–1267.

2. Resch A., Rosenstein R., Nerz C., Götz F. Differential Gene Expression Profiling of *Staphylococcus aureus* Cultivated under Biofilm and Planktonic Conditions // Appl. Environ. Microbiol. – 2005. – Vol. 71. – № 5. – P. 2663–2676.
3. Tishkov V.I., Goncharenko K.V., Alekseeva A.A., Kleymenov S.Yu., Savin S.S. / Role of a Structurally Equivalent Phenylalanine Residue in Catalysis and Thermal Stability of Formate Dehydrogenases from Different Sources // Biochemistry(Moscow). – 2015. – Vol. 80. – № 13. – P. 1690–1700.
4. Weckbecker A., Gröger H., Hummel W. / Regeneration of nicotinamide coenzymes: principles and applications for the synthesis of chiral compounds. // Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. Germany. – 2010. – Vol. 120. – P. 195–242.
5. Tishkov V.I., Pometun A.A., Stepashkina A.V., Fedorchuk V.V., Zarubina S.A., Kargov I.S., Atroshenko D.L., Parshin P.D., Shelomov M.D., Kovalevski R.P., Boiko K.M., Eldarov M.A., D’Oronzo E., Facheris S., Secundo F., Savin S.S. / Rational Design of Practically Important Enzymes // Moscow Univ. Chem. Bull. – 2018. – Vol. 73. – № 1. – P. 1–6.
6. Pometun A.A., Boyko K.M., Yurchenko T.S., Nikolaeva A.Yu., Kargov I.S., Atroshenko D.L., Savin S.S., Popov V.O., Tishkov V.I. Highly-Active Recombinant Formate Dehydrogenase from Pathogenic Bacterium *Staphylococcus aureus*: Preparation and Crystallization // Biochemistry(Moscow). – 2020. – Vol. 85. – № 6. – P. 689–696.