

УДК 548.73

## ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОЙ ФОРМИАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ИЗ ТЕРМОТОЛЕРАНТНЫХ ДРОЖЖЕЙ *OGATAEA PARAPOLYMORPHA* DL-1 И КРИСТАЛЛИЗАЦИЯ АПО- И ХОЛО-ФОРМ ФЕРМЕНТА

А.А. Пометун<sup>1,2,3\*</sup>, К.М. Бойко<sup>2\*</sup>, С.А. Зубанова<sup>1,3\*</sup>, А.Ю. Николаева<sup>4</sup>,  
Д.Л. Агрошенко<sup>1,2,3</sup>, С.С. Савин<sup>1,3</sup>, В.И. Тишков<sup>1,2,3\*\*</sup>

(<sup>1</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет; <sup>2</sup> Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН; <sup>3</sup> ООО «Инновации и высокие технологии МГУ»; <sup>4</sup> Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»; \*\*e-mail: vitishkov@gmail.com)

$\text{NAD}^+$ -зависимая формиатдегидрогеназа из термотолерантных дрожжей *Ogataea parapolyomorpha* DL-1 (ОраFDH, КФ 1.2.1.2) с дополнительным остатком глицина на N-конце и ее двойной мутант ОраFDH\_AD были экспрессированы в клетках *E. coli* с выходом по активности более 6000 ед. на 1 л среды. Ферменты были очищены до гомогенного состояния с выходом 62%. Методика выделения включала разрушение клеток ультразвуком, термообработку бесклеточного экстракта при 55 °С в течение 15 мин и гидрофобную хроматографию на Phenyl Sepharose Fast Flow. Проведены эксперименты по кристаллизации как свободной ОраFDH, так и в присутствии субстрата  $\text{NAD}^+$  и конкурентного по формиату ингибитора азидиона (апо- и холо-формы соответственно), однако были получены кристаллы только апо-формы фермента размером 50×50×20 мкм. Кристаллы холо-ОраFDH дикого типа получить не удалось. Поэтому далее для получения кристаллов холо-формы использовали мутантную ОраFDH\_AD, в которой по сравнению с исходным ферментом улучшены показатели температурной и химической стабильности. В результате были получены кристаллы для холо-форм ОраFDH\_AD. Кристаллы как апо-, так и холо-формы имеют достаточное качество для сбора дифракционных данных и последующего определения трехмерной структуры.

**Ключевые слова:** формиатдегидрогеназа, *Ogataea parapolyomorpha* DL-1, выделение и очистка, мутантный фермент, кристаллизация.

**Принятые сокращения:** ОраFDH, СбоFDH, SauFDH, PseFDH – формиатдегидрогеназы из дрожжей *Ogataea parapolyomorpha* DL-1, *Candida boidinii* и бактерий *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas* sp.101 соответственно.

$\text{NAD}^+$ -зависимая формиатдегидрогеназа (FDH, КФ 1.2.1.2) широко используется на практике, в том числе для регенерации восстановленного кофактора  $\text{NAD(P)H}$  в процессах тонкого органического синтеза хиральных соединений, для определения формиата или  $\text{NAD}^+$  в сложных смесях, включая различные ткани человека. В этих условиях кроме каталитической константы очень важным параметром является величина константы Михаэлиса ( $K_M$ ) по субстрату [1, 2]. В нашей лаборатории был клонирован ген формиатдегидрогеназы из термотолерантных метилотрофных дрожжей *Ogataea parapolyomorpha* DL-1 [3] (ОраFDH). Этот фермент по сравнению с другими FDH из бактерий и дрожжей имеет такую же величину удельной активности (6,5 ед. активно-

сти на 1 мг белка), однако величины констант Михаэлиса как по коферменту  $\text{NAD}^+$  (12 мкм), так и по второму субстрату формиату (1,3 мМ) в несколько раз ниже [1–3]. Близкие значения  $K_M$  имеют формиатдегидрогеназы из растений [4, 5], однако по сравнению с ОраFDH у них более низкая удельная активность и существенно более низкая температурная стабильность. В целом, ОраFDH является наиболее термостабильным ферментом среди формиатдегидрогеназ из эукариот [6]. В работе [7] был предложен метод определения наномолярных количеств  $\text{NAD}^+$  в сложных биологических образцах. Например, при количестве пробы 0,5–2,5 мг мозга крысы чувствительность определения при пересчете на 1 г образца составила 78 нмоль.

\*Авторы имеют равный вклад в данную статью.

При исследовании формиатдегидрогеназ мы всегда стараемся использовать данные о структуре фермента. Это позволяет после анализа структуры предложить перспективные положения и замены для получения фермента с улучшенными или новыми свойствами. Недавно нами были получены кристаллы апо- и холо-форм, а также проведены предварительные кристаллографические исследования структуры формиатдегидрогеназы из патогенных бактерий *Stahyloccoccus aureus* [8]. В настоящей статье описан способ получения препаративного количества формиатдегидрогеназы ОраFDH дикого типа wt-ОраFDH и ее мутанта с двойной заменой ОраFDH\_AD, которые были использованы для получения кристаллов апо- и холо-форм фермента.

### Экспериментальная часть

#### **Экспрессия ОраFDH дикого типа (wt-ОраFDH) и мутантной ОраFDH\_AD в клетках *E. coli***

Для получения штаммов-продуцентов фермента дикого типа и его мутанта ОраFDH\_AD проводили трансформацию клеток *E. coli* BL21(DE3) CodonPlus/pLysS плазмидам pОраFDH и pОраFDH\_AD. С чашки Петри брали единичную колонию и культивировали в 4 мл среды 2YT (16 г/л бактотриптона, 10 г/л дрожжевого экстракта («Difco», США), 5 г/л NaCl; pH 7,0), содержащей антибиотика хлорамфеникол (25 мкг/мл) и ампициллин (150 мкг/мл), на качалке при 37 °C и 180 об/мин до установления величины поглощения среды  $A$ , равной 0,8–0,9 при длине волны 600 нм. Полученный инокулят пересеивали в колбу (1000 мл) с отбойниками, где находилось 200 мл среды 2YT с хлорамфениколом (25 мкг/мл) и ампициллином (150 мкг/мл), и культивировали на качалке при 120 об/мин и температуре 37 °C. По достижении величины поглощения среды  $A_{600} = 0,8–0,9$  в среду добавляли раствор концентрированной лактозы до концентрации 20 г/л, температуру снижали до 25 °C и продолжали культивирование до утра при 120 об/мин. Утром клетки осаждали на центрифуге «Beckman J-21» («Beckman», США) в течение 10 мин при 6000 об/мин, 4 °C (стаканы 250 мл, ротор «J14»).

#### **Выделение и очистка**

Очистку проводили согласно следующей методике:

разрушение клеток заморозкой-разморозкой и ультразвуком, термообработка бесклеточного экстракта, высаживание части примесных белков сульфатом аммония, гидрофобная хро-

матография на фенол-сефарозе, обессоливание (перевод в требуемый буфер) с помощью гель-фильтрации через «Sephadex G-25 Fine». Осажденные после культивирования клетки ресуспендировали в 0,1 М Na-фосфатном буфере (pH 8,0) до концентрации биомассы 10 мас.%) и замораживали при –20 °C на 6 ч. Далее клетки размораживали на водяной бане (10 °C) и разрушали ультразвуком на дезинтеграторе «Branson Ultrasonic 250» («Branson», США) в течение 10 мин (10 циклов по 1 мин), постоянно охлаждая при 4 °C. Полученную суспензию без центрифугирования подвергали термообработке в течение 15 мин при 55 °C. Далее колбу оставляли при комнатной температуре на 30 мин и осаждали клеточный дебрис центрифугированием (30 мин, 18 000 об/мин, 4 °C, ротор «J-20»). Супернатант отделяли от осадка, к нему при постоянном перемешивании добавляли твердый сульфат аммония до концентрации 30% от насыщения и оставляли на ночь при 4 °C. Образовавшуюся суспензию центрифугировали (30 мин, 18 000 об/мин, 4 °C, ротор «J-20»), супернатант декантировали и наносили на колонку 2,5×10 см с высокозамещенной «Phenyl Sepharose Fast Flow» («Pharmacia Biotech», Австрия), уравновешенную раствором сульфата аммония (30% от насыщения) в 0,1 М Na-фосфатном буфере с pH 7,0 (буфер А). После нанесения фермента колонку промывали 300 мл буфера А. Фермент элюировали линейным градиентом сульфата аммония (35–0% от насыщения) в 0,1 М фосфатном буфере (pH 7,0), собирали фракции объемом 5 мл и в каждой измеряли поглощение на 280 нм ( $A_{280}$ ) и ферментативную активность. Отбирали фракции с постоянным отношением (Активность/ $A_{280}$ ). Обессоливание и перевод фермента в требуемый буфер проводили с помощью гель-фильтрации через «Sephadex G25 Fine» (Pharmacia Fine Chemicals, Швеция).

#### **Измерение активности**

Активность ферментов определяли спектрофотометрически по образованию NADH на длине волны 340 нм ( $\epsilon_{340} = 6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) на спектрофотометре «Schimadzu UV 1800» («Schimadzu», Германия) при 30 °C в 0,1 М натрий-фосфатном буфере (pH 7,0). Концентрация формиата натрия и  $\text{NAD}^+$  в кювете составляла 0,15 М и 1,0 мг/мл соответственно.

#### **Анализ чистоты ферментных препаратов**

Чистоту препаратов wt-ОраFDH и ОраFDH\_AD на разных стадиях очистки определяли с по-

мощью аналитического электрофореза в 12%-м полиакриламидном геле в присутствии 0,1%-го додецилсульфата натрия на приборе «Mini Protean II» («Bio-Rad», США) по протоколам фирмы-производителя.

### **Определение концентрации ферментов**

На разных стадиях очистки, а также при подготовке экспериментов по кристаллизации общую концентрацию белков определяли по методу Бредфорд по протоколу фирмы «Bio-Rad» (<http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/4110065A.pdf>). Однако вместо бычьего сывороточного альбумина в качестве стандарта использовали очищенную рекомбинантную FDH из бактерий *Pseudomonas* sp.101.

### **Анализ препаратов wt-ОраFDH и ОраFDH<sub>AD</sub> с помощью MALDI-масс-спектрометрии**

Для проведения этих экспериментов использовали оборудование Центра коллективного пользования «Промышленные биотехнологии» Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

При подготовке образца после аналитического электрофореза в полиакриламидном геле проводили триптический гидролиз белка. Из геля, окрашенного с помощью Coomassie Brilliant Blue, вырезали кусочек размером 3–4 мм<sup>3</sup> с полосой целевого фермента. Для удаления красителя кусочек дважды промывали в 100 мкл 40%-го раствора ацетонитрила в 0,1 М NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> в течение 20 мин при 37 °С. После удаления раствора к гелю для дегидратации добавляли 100 мкл ацетонитрила. Для удаления ацетонитрила кусочек геля высушивали и затем к нему прибавляли 3,5 мкл раствора (15 мкг/мл) модифицированного трипсина («Promega») в 0,05 М NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>. Гидролиз проводили в течение 20 ч при 37 °С, затем к раствору добавляли 5,25 мкл 0,5%-й трифторуксусной кислоты (ТФУ) в 50%-м растворе водного ацетонитрила и тщательно перемешивали. Надгелевый раствор использовали в качестве исходного раствора для получения MALDI-масс-спектров.

Для масс-спектрометрического анализа на мишени смешивали 1,5 мкл раствора образца и 0,5 мкл раствора 2,5-дигидроксibenзойной кислоты (10 мг/мл, «Aldrich», США) в 20%-м водном ацетонитриле, 0,5% ТФУ («Merk», Германия). Полученную смесь высушивали на воздухе.

Масс-спектры получены на тандемном время-пролетном масс-спектрометре «MALDI-TOF/TOF Ultraflextreme» («Bruker», Германия), оснащенном УФ-лазером (Nd) в режиме положительных ионов с использованием рефлектрона. Точность измеренных значений моноизотопной массы после докалибровки по пикам автолиза трипсина составляла 0,002–0,011% (20–110 ppm). Спектры получали в диапазоне 500–6500 *m/z*. Мощность лазера выбирали оптимальную для достижения наилучшего разрешения.

Для идентификации белков использовали программу Mascot ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)). Для обработки масс-спектров применяли программный пакет FlexAnalysis 3.3 («Bruker Daltonics», Германия). С помощью программы Mascot (опция «пептидный фингерпринт») проводили поиск в локальной базе данных с указанной выше точностью, учитывая возможные модификации: Acetyl (Protein N-term), Gln->pyro-Glu (N-term Q), Oxidation (M), Propionamide (C). Кандидатные белки, имеющие параметры достоверности score >42 в базе данных NCBI, считали определенными надежно (*p* < 0,05).

### **Кристаллизация**

Условия кристаллизации подбирали методом диффузии в парах (вариант «сидячая капля») с помощью роботизированной системы кристаллизации фирмы «Rigaku CrystalMation» (США) при температуре 15 °С в термостатируемом помещении, используя стандартные наборы для кристаллизации глобулярных белков («Hampton Research», США): Crystal Screen HT, Crystal Screen Cryo HT, Index HT, PEG/Ion HT, PEGRx HT и SaltRx HT. Растворы белка с концентрацией 8 мг/мл (0,1 М HEPES (pH 7,5), 0,15 М NaCl, 10%-я сахароза) перед кристаллизацией центрифугировались в течение 10 мин для удаления инородных частиц и агрегатов. Для получения холо-формы фермента к раствору белка перед кристаллизацией добавляли NAD<sup>+</sup> и конкурентный по формату ингибитор ОраFDH азид натрия до финальной концентрации 7,0 и 11,0 мМ соответственно. Для кристаллизации использовали кристаллизационные планшеты на 96 лунок («ArtRobbins»). Проверку кристаллизационных проб проводили с помощью бинокулярного микроскопа «Kruss» (Германия).

Оптимизацию полученных условий кристаллизации осуществляли методом диффузии в парах (вариант «сидячая капля») в 24 луночных планшетах («VDX», США). В каждую лунку

планшета добавляли по 400 мкл раствора осадителя; 1,5 мкл раствора белка и эквивалентное количество противораствора смешивали и наносили на силиконизированное стекло диаметром 22 мм («Hampton Research», США). В случае апо-фермента использовали ОраFDH дикого типа, а в случае холо-формы – мутант ОраFDH\_AD.

### Результаты и их обсуждение

#### Получение рекомбинантных ОраFDH дикого типа и ее мутанта ОраFDH\_AD

Качество получаемых кристаллографических данных зависит от многих параметров и в первую очередь от чистоты фермента, критично влияющей на качество выращенных кристаллов. Поэтому получение высокоочищенных (лучше всего гомогенных) препаратов фермента является первой и важной стадией. В нашей лаборатории клонировано более 9 генов формитдегидрогеназ из разных источников. Для всех ферментов созданы штаммы *E. coli* – суперпродуценты целевых рекомбинантных белков. Как правило, уровень экспрессии наших формиатдегидрогеназ составляет не менее 35–45% от общего количества растворимых белков клетки. Это позволяет получать большие количества высокоочищенного белка без использования аффинных меток, поскольку наличие на N- или C-конце FDH-последовательности из 6–12 остатков гистидина (His-tag) может приводить к изменению как каталитических свойств, так и стабильности [3, 9–12]. В случае ОраFDH отсутствие His-tag

является очень важным моментом. Сравнение кинетических параметров ОраFDH, полученной в нашей лаборатории [3], и фермента с His-tag на C-конце, полученным в работе [9], показало, что наличие аффинной метки приводит к значительному ухудшению кинетических параметров – каталитическая константа снижается почти в два раза (с 4,5 до 2,3 с<sup>-1</sup>), а константа Михаэлиса по NAD<sup>+</sup> возрастает в 7 раз (с 12 до 83 мкм) [3, 9], поэтому в нашей работе мы кристаллизовали фермент без аффинной метки. Единственным отличием полученной нами рекомбинантной ОраFDH от нативного фермента является введение на N-конец дополнительного остатка глицина. Это связано с тем, что в исходном гене *orafdh* после стартового остатка метионина стоит кодон, кодирующий заряженную аминокислоту лизин. Это может негативно сказываться на стабильности целевого белка при его экспрессии в клетках *E. coli*. Например, PseFDH, у которой на N-конце находится остаток аланина, стабильна в клетках *E. coli* даже после 72 ч культивирования, в то время как высокомолекулярный с ОраFDH фермент из дрожжей *Candida boidinii* с остатком лизина на N-конце начинает деградировать в клетках *E. coli* уже через 8–10 ч после индукции (собственные данные). Согласно правилу Варшавского [13], остаток лизина, находящийся на N-конце белка, является одним из остатков, которые способствуют быстрой деградации белка в клетке. В то же время белкам с остатком глицина на N-конце свойственна высокая сопротивляемость к биодеградации в клетке.

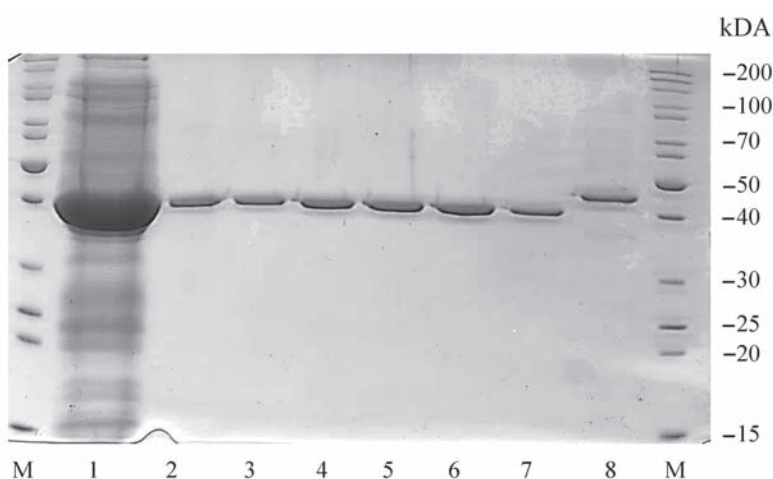


Рис. 1. Аналитический электрофорез препаратов wt-ОраFDH в 12%-м полиакриламидном геле в присутствии 1%-го додецилсульфата натрия (M – белки-маркеры молекулярной массы, 1 – бесклеточный экстракт, 2–6 – фракции wt-ОраFDH, собранные после гидрофобной хроматографии, 7 – препарат wt-ОраFDH после обессоливания, 8 – препарат PseFDH SM4 после обессоливания)

Результаты экспрессии wt-ОраFDH и мутанта ОраFDH\_AD в клетках *E. coli*

Параметр	Фермент	
	wt-ОраFDH	ОраFDH_AD
Выход влажной биомассы, г на 1 л среды*	26	27
Активность, ед. активности на 1 л среды*	6000	6200
Выход целевого фермента, г на 1 л среды**	1,0	1,0

\*Среднее значение, полученное из трех независимых экспериментов; \*\*выход рассчитывали по величине удельной активности очищенного фермента (6 ед/мг для ОраFDH).

**Культивирование штаммов-продуцентов, рекомбинантных wt-ОраFDH, и мутанта ОраFDH\_AD.** В нашей лаборатории для получения рекомбинантных формиадегидрогеназ используется система экспрессии на основе плазмид серии pET, а также штаммов *E. coli* BL21(DE3) и *E. coli* BL21(DE3)CodonPlus (для прокариотических и эукариотических FDH соответственно) [1–6]. В этой системе уровень экспрессии формиадегидрогеназ составляет до 40% и более от общего растворимого белка клетки. Эту систему мы успешно использовали для получения как wt-ОраFDH, так и ее мутанта ОраFDH\_AD.

Как показано на рис. 1 (дорожка 1), после индукции лактозой происходит суперэкспрессия

нашего фермента. Через 14 ч после индукции общий выход wt-ОраFDH по активности составляет 6000 ед. или 1 г целевого фермента на 1 л среды (таблица). Аналогичные результаты были получены и в случае мутанта ОраFDH\_AD (таблица).

**Очистка рекомбинантных wt-ОраFDH и мутанта ОраFDH\_AD.** В нашей лаборатории для очистки формиадегидрогеназ, экспрессированных в клетках *E. coli*, была разработана унифицированная методика, включающая фракционирование бесклеточного экстракта сульфатом аммония с последующей гидрофобной хроматографией на Phenyl Sepharose Fast Flow [14]. Для формиадегидрогеназ с высокой термостабильностью перед фракционированием  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  проводится термообработка бесклеточного

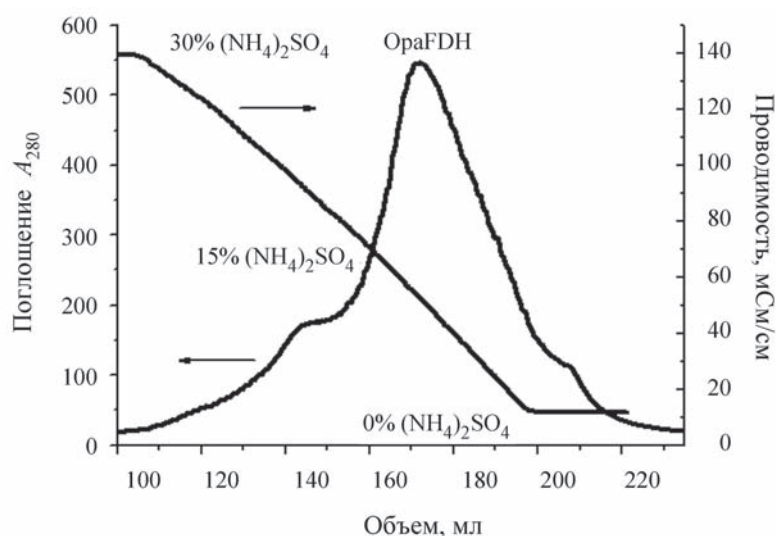


Рис. 2. Гидрофобная хроматография wt-ОраFDH на колонке с Phenyl Sepharose Fast Flow (колонка 1×10 см; нисходящий линейный градиент сульфата аммония (30–0% от насыщения; 0,1 М натрий-фосфатный буфер (pH 7,0); 0,01 М ЭДТА; скорость элюции 1 мл/мин)

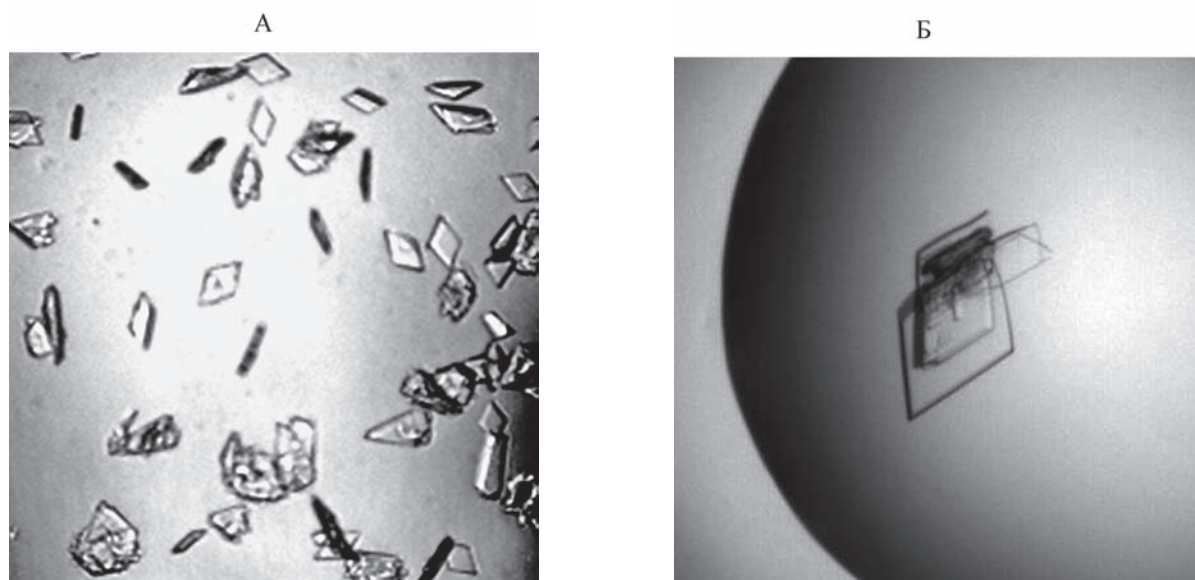


Рис. 3. Кристаллы холо-формы wt-OpaFDH (А), кристаллы холо-формы OpaFDH\_AD (Б)

точного экстракта при 55 °С в течение 15–25 мин [2]. Данные дифференциальной сканирующей калориметрии показали, что при повышенной температуре wt-OpaFDH является самой стабильной среди эукариотических формидегидрогеназ, немного уступая по этому параметру только наиболее термостабильным FDH из бактерий *Pseudomonas* sp.101 и *Staphylococcus aureus* [6]. У мутанта OpaFDH\_AD термостабильность еще выше, чем у wt-OpaFDH (см. ниже). Поэтому в процедуру очистки wt-OpaFDH и OpaFDH\_AD также была введена стадия термообработки бесклеточного экстракта в течение 15 мин при 55 °С. Такая обработка приводит к денатурации части белков *E. coli*, обеспечивает формирование крупнодисперсного осадка и упрощает последующее фракционирование сульфатом аммония.

На рис. 2 приведены данные по очистке wt-OpaFDH с помощью гидрофобной хроматографии на фенил сефарозе. Как и в случае формидегидрогеназ из других источников, одной стадии гидрофобной хроматографии оказалось достаточно для получения гомогенных препаратов, о чем свидетельствуют данные аналитического электрофореза (рис. 1). Как видно из рис. 2, практически во всех собранных после гидрофобной хроматографии фракциях с wt-OpaFDH мы имеем гомогенный препарат. Аналогичные результаты были получены и для мутанта OpaFDH\_AD. В обоих случаях выход ферментов по активности составил около 62%. В обоих случаях было получено около 300 мг целевого белка. Анализ препаратов wt-OpaFDH и OpaFDH\_AD с по-

мощью тандемной MALDI масс-спектрометрии показал идентичность аминокислотной последовательности белка последовательности ферментов, кодируемых в плазмидах pOpaFDH\_AD и pOpaFDH, т.е. при экспрессии и очистке wt-OpaFDH и OpaFDH\_AD не претерпевают посттрансляционной модификации.

Получение более 300 мг каждого из гомогенных препаратов wt-OpaFDH и мутанта OpaFDH\_AD позволило перейти к экспериментам по кристаллизации.

### Кристаллизация

Первые попытки кристаллизации wt-OpaFDH оказались невозможными в связи с тем, что фермент в фосфатном буфере при концентрации выше 2–3 мг/мл выпадал в осадок. Этот результат можно было ожидать, поскольку с аналогичной проблемой ранее столкнулись в случае кристаллизации высокомолекулярной с OpaFDH формидегидрогеназы из дрожжей *Candida boidinii* [15]. Такая низкая концентрация фермента делает невозможным получение кристаллов.

Проведено множество экспериментов по оптимизации условий для получения препаратов OpaFDH с концентрацией не менее 5 мг/мл. Варьировали тип буферной системы (Tris, HEPES, MOPS), концентрацию соли, значение pH, добавки (в первую очередь сахара – сахароза, рамноза, арабидоза и трегалоза). В результате удалось получить раствор wt-OpaFDH с концентрацией 8 мг/мл в буфере (0,1 М HEPES; 0,15 М NaCl; 10%-я сахароза; pH 7,5). Было установлено, что добавление NaCl в концентрации 0,15 М

не влияет на активность фермента, но положительно сказывается на растворимости – в течение нескольких дней не происходит снижения значения активности и не образуется осадок при хранении (4 °С). После этого стало возможным перейти непосредственно к экспериментам по кристаллизации.

Начальный поиск условий кристаллизации был проведен с wt-ОраFDH как для свободного фермента, так и в комплексе с кофактором NAD<sup>+</sup> и азид-ионом. В результате были получены кристаллы апо-формы размерами ~50×50×20 мкм (рис 3, А). Кристаллы росли в течение 7 дней, в условиях bis-Tris (рН 6,5), 0,1 М хлорид магния; 26% ПЭГ 3350.

Кристаллы холо-формы wt-ОраFDH получить не удалось. Это может быть связано с разными причинами. Например, конформационные изменения молекулы белка при связывании субстрата могут приводить к стерическим ограничениям в упаковке молекул, препятствующим кристаллизации. В случае СбоFDH авторы проводили специальные эксперименты по модификации поверхности остатков фермента методом направленного мутагенеза, что позволило закристаллизовать фермент [15]. В связи с вышесказанным было решено провести кристаллизацию мутантной ОраFDH с двойной заменой Cys230Ala/Tyr286Asp (ОраFDH\_AD) [16]. Оба остатка расположены на поверхности белковой глобулы в кофермент-связывающем домене. По своему пространственному положению в белковой глобуле они эквивалентны остаткам Cys255 и Phe311 молекулы формиатдегидрогеназы из бактерий *Pseudomonas* sp.101 (PseFDH) [17]. Как и в случае PseFDH, мутация Cys230Ala обеспечивает увеличение химической стабильности фермента против инактивации пероксидом водорода [18], но снижает в несколько раз термостабильность. Замена Tyr286Asp, как и в случае ферментов из сои [5] и *Pseudomonas* sp.101 [17], не влияет на химическую стабильность, но значительно повышает термостабильность. В результате термостабильность двойного мутанта в несколько раз выше по сравнению с wt-ОраFDH [16]. Этот подход позволил получить кристаллы холо-формы ОраFDH\_AD в условиях 1,6 М сульфата аммония, 5%-го 2-метилпентадиола-2,4, 7 мМ NAD и 10 мМ азид натрия (рис. 3, Б).

Таким образом, в результате настоящего исследования получено препаративное количе-

ство гомогенных препаратов рекомбинантной формиатдегидрогеназы из термотолератных дрожжей *Ogataea parapolymorpha* DL-1 и ее двойного мутанта ОраFDH\_AD. Эти препараты были использованы для кристаллизации. В случае wt-ОраFDH получены кристаллы только апо-формы. Кристаллы холо-формы получены с мутантной ОраFDH\_AD в присутствии 7 мМ NAD<sup>+</sup> и 10 мМ азид натрия. Полученные кристаллы были пригодны для дальнейших кристаллографических экспериментов для определения их структуры. Следует отметить, что результаты экспериментов по получению холо-формы ОраFDH отличаются от результатов аналогичных экспериментов с другими формиатдегидрогеназами. Как правило, формиатдегидрогеназы с достаточно высокой термостабильностью образуют кристаллы для обеих форм фермента. В случае формиатдегидрогеназ с невысокой термостабильностью свободный фермент не кристаллизуется. Образование тройного комплекса FDH-NAD<sup>+</sup>-азид приводит к сильному повышению температурной стабильности фермента. Поэтому, как правило, для малостабильных формиатдегидрогеназ в первую очередь получают кристаллы холо-форм. В нашем случае для высокостабильной ОраFDH удалось получить кристаллы апо-формы. Для получения кристаллов холо-формы пришлось использовать мутант ОраFDH\_AD, который по сравнению с исходным ферментом обладает повышенной химической и температурной стабильностью. Определение структур позволит перейти к направленному изменению свойств ОраFDH с помощью рационального дизайна.

При проведении исследований использовалось оборудование Центра коллективного пользования «Промышленные биотехнологии» Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 18-34-20098).

Конфликта интересов нет.

Дополнительных материалов нет.

Дополнительной информации нет.

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tishkov V.I., Popov V.O. // Biochemistry (Moscow). 2004. Vol. 69. N 11. P. 1252 (DOI: 10.1007/s10541-005-0071-x).
2. Tishkov V.I., Popov V.O. // Biomol. Eng., 2006, Vol. 23. N 2-3. P. 89 (DOI: 10.1016/j.bioeng.2006.02.003).
3. Tishkov V.I., Pometun A.A., Stepashkina A.V., Fedorchuk V.V., Zarubina S.A., Kargov I.S., Atroshenko D.L., Parshin P.D., Kovalevski R.P., Boiko K.M., Eldarov M.A., D'Oronzo E., Facheris S., Secundo F., Savin S.S. // Moscow Univ. Chem. Bull. 2018. Vol. 73. N. 2. P. 1 (DOI: 10.3103/S0027131418020153).
4. Alekseeva A.A., Savin S.S., Tishkov V.I. // Acta Naturae 2011. Vol. 3. N 4(11). P. 38 (DOI: 10.32607/20758251-2011-3-4-38-54).
5. Kargov, I.S., Kleymenov, S.Y., Savin, S.S., Tishkov, V.I., Alekseeva, A.A. // Prot. Eng. Des. Select. 2015. Vol. 28. N 6. P. 171 (DOI: 10.1093/protein/gzv007).
6. Pometun A.A., Kleymenov S.Yu., Zarubina S.A., Kargov I.S., Parshin P.D., Sadykhov E.G., Savin S.S., Tishkov V.I. // Moscow Univ. Chem. Bull. 2018. Vol. 73. N 2. P. 80 (DOI: 10.3103/S002713141802013X).
7. Artiukhov A.V., Pometun A.A., Zubanova S.A., Tishkov V.I., Bunik V.I. // Analytical Biochemistry 2020. Vol. 603. Art 113797 (DOI: 10.1016/j.ab.2020.113797).
8. Pometun A.A., Boyko K.M., Yurchenko T.S., Nikolaeva A.Yu., Atroshenko D.L., Savin S.S., Popov V.O., Tishkov V.I. // Biochemistry (Moscow). 2020. Vol. 85, N 6. P. 689–696 (DOI: 10.1134/S0006297920060061).
9. Yu S., Zhu L., Zhou C., An T., Zhang T., Jiang B., Mu W. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2014. Vol. 98. P. 1621 (DOI: 10.1007/s00253-013-4996-5).
10. Ordu E.B., Karagüler N.G. // Prepar. Biochem. Biotechnol. 2007. Vol. 37. P. 333 (DOI: 10.1080/10826060701593233).
11. Esen H., Alpdağtaş S., Mervan-Çakar M., Binay B. // Prepar. Biochem. Biotechnol. 2019. Vol. 49. P. 529 (DOI: 10.1080/10826068.2019.1599394).
12. Pometun A.A., Parshin, P.D., Galanicheva N.P., Uporov I.V., Atroshenko D.L., Savin S.S., Tishkov V.I. // Moscow Univ. Chem. Bull 2020. Vol. 75. N 4. P. 25 (DOI: 10.3103/S0027131420040057).
13. Varshavsky A. // Proc. Nat. Acad. Sci. 2019. Vol.116. N 2. P. 358 (DOI 10.1073/pnas.1816596116).
14. Rojkova A.M., Galkin A.G., Kulakova L.B., Serov A.E., Savitsky P.A., Fedorchuk V.V., Tishkov V.I. // FEBS Lett. 1999. Vol. 445. N 1. P. 183 (DOI: 10.1016/S0014-5793(99)00127).
15. Schirwitz K., Schmidt A., Lamzin V.S. // Protein Sci. 2007. Vol. 16. N 2. P. 1146 (DOI: 10.1110/ps.062741707).
16. Зарубина С.А. // Дис. ... канд. хим. наук. М., 2018.
17. Tishkov V.I., Goncharenko K.V., Alekseeva A.A., Kleymenov S.Yu., Savin S.S. R // Biochemistry (Moscow). 2015. Vol. 80. N 13. P.1690 (DOI: 10.1134/S000629791513005).
18. Savin S.S., Tishkov V.I. // Acta Naturae 2010. Vol. 2. N 1 (4). P. 97 (DOI 10.32607/20758251-2010-2-1-97-101).

Поступила в редакцию 10.10.2020

Получена после доработки 18.10.2020

Принята к публикации 20.10.2020

## PREPARATION OF RECOMBINANT FORMATE DEHYDROGENASE FROM THERMOTOLERANT YEAST *OGATAEA PARAPOLYMORPHA* AND CRYSTALLIZATION OF APO- AND HOLO- FORMS OF THE ENZYME

A.A. Pometun<sup>1,2,3\*</sup>, K.M. Boyko<sup>2\*</sup>, S.A. Zubanova<sup>1,3\*</sup>, A.Yu. Nikolaeva<sup>4</sup>, D.L. Atroshenko<sup>1,2,3</sup>, S.S. Savin<sup>1,3</sup>, V.I. Tishkov<sup>1,2,3\*\*</sup>

(<sup>1</sup> Lomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry; <sup>2</sup> Bach Institute of Biochemistry, Research Centre “Fundamentals of Biotechnology” of the Russian Academy of Sciences; <sup>3</sup> Innovations and High Technologies MSU Ltd; <sup>4</sup> National Research Center “Kurchatov institute”; \*\*e-mail: vitishkov@gmail.com)

**NAD<sup>+</sup>-dependent formate dehydrogenase from thermotolerant yeast *Ogataea parapolyomorpha* DL-1 (OpaFDH, EC 1.2.1.2) with additional Gly residue at N-terminus and its double mutant OpaFDH\_AD were over expressed in *E. coli* cells with yield 6000 and 6200 U per liter of cultivation medium, respectively. Purified enzymes were obtained as homogeneous preparations with activity yield 62%. Purification procedure included ultrasonic cell disruption, heat treatment of cell free extract at 55 °C for 15 min and hydrophobic chromatography on Phenyl Sepharose Fast Flow. Crystallization experiments with wild-type OpaFDH resulted in preparation of crystals of apo- but not holo- form. Crystals of holo-form were obtained with mutant OpaFDH\_AD only in the presence**



**of 7 mM NAD<sup>+</sup> and 10 mM sodium azide. Size and quality of crystals were enough for collection of X-ray diffraction data.**

**Key words:** formate dehydrogenase, *Ogataea parapolymorpha* DL-1, expression, purification, crystallization, apo- and holo- forms.

**Сведения об авторах:** *Пометун Анастасия Александровна* – ст. науч. сотр. лаборатории молекулярной инженерии Института биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, – ст. науч. сотр. ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, докт. хим. наук (aарometun@gmail.com); *Бойко Константин Михайлович* – ст. науч. сотр. лаборатории инженерной энзимологии Института биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, канд. биол. наук (kmb@inbi.ras.ru); *Зубанова (Зарубина) София Александровна* – науч. сотр. химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, науч. сотр. ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», ст. науч. аналитик ООО «РусБио Венчурс», канд. хим. наук (zarubina.sophia@gmail.com); *Николаева Алена Юрьевна* – инженер-исследователь НИЦ «Курчатовский институт» (aishome@mail.ru); *Атрошенко Денис Леонидович* – мл. науч. сотр. лаборатории молекулярной инженерии Института биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, науч. сотр. ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, канд. хим. наук (atrdenis@gmail.com); *Савин Святослав Сергеевич* – науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», канд. биол. наук (savinslava@gmail.com); *Тишков Владимир Иванович* – профессор химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова; зав. лабораторией молекулярной инженерии Института биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН; ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», докт. хим. наук, профессор (vitishkov@gmail.com).