

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

УДК 577.322.63

**ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА КОФЕРМЕНТНОЙ
СПЕЦИФИЧНОСТИ ФЕНИЛАЦЕТОНМОНООКСИГЕНАЗЫ
ИЗ *THERMOBIFIDA FUSCA* МЕТОДОМ НАПРАВЛЕННОГО
МУТАГЕНЕЗА**

Павел Дмитриевич Паршин¹, Устина Александровна Мартысюк², Денис Леонидович Атрошенко^{1,3}, Анна Владимировна Попинако³, Святослав Сергеевич Савин^{1,3}, Евгений Владимирович Пометун⁴, Владимир Иванович Тишков^{1,3}, Анастасия Александровна Пометун^{1,3}

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, Россия

² Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия

³ Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Россия

⁴ Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), Москва, Россия

Авторы для переписки: Владимир Иванович Тишков, vitishkov@gmail.com; Анастасия Александровна Пометун, aarometun@gmail.com

Аннотация. Фенилацетонмонооксигеназа из *Thermobifida fusca* (КФ 1.14.13.92, РАМО) принадлежит к семейству монооксигеназ Байера–Виллигера и катализирует реакции окисления различных ароматических кетонов до соответствующих сложных эфиров с использованием NADPH в качестве кофактора. В работе проанализирована структура центра связывания кофактора, выбраны наиболее важные для узнавания фосфатной группы кофактора аминокислотные остатки и проведено моделирование аминокислотных замен, потенциально способных привести к изменению коферментной специфичности фермента от NADPH к NADH. На основе проведенного моделирования предложены наиболее перспективные аминокислотные замены T218D, T218E, K336A, K336R. С помощью направленного мутагенеза получены генетические конструкции, которые содержат гены, кодирующие РАМО с соответствующими аминокислотными заменами, проведены экспрессия и очистка ферментов. Полученные мутантные РАМО способны связывать NADH, но не обладают способностью катализировать окисление бензил-ацетона в присутствии NADH и демонстрируют ухудшение констант Михаэлиса по NADPH. Каталитические константы изучаемых мутантных ферментов немного уменьшаются, однако это изменение находится в пределах погрешности эксперимента.

Ключевые слова: фенилацетонмонооксигеназа, монооксигеназа Байера–Виллигера, белковая инженерия, направленный мутагенез, коферментная специфичность

Финансирование. Исследование выполнено при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-34-90120). Использовалось оборудование Центра коллективного пользования «Геном» Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН и Центра

коллективного пользования «Промышленные биотехнологии» Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук».

Для цитирования: Паршин П.Д., Мартысюк У.А., Атрошенко Д.Л., Попинако А.В., Савин С.С., Пометун Е.В., Тишков В.И., Пометун А.А. Исследование механизма коферментной специфичности фенилацетонмонооксигеназы из *Thermobifida fusca* методом направленного мутагенеза // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. Т. 63. № 5. С. 334–343.

ORIGINAL ARTICLE

**STUDY OF MECHANISM OF COENZYME SPECIFICITY
OF PHENYLACETONE MONOOXYGENASE FROM *THERMOBIFIDA
FUSCA* BY SITE-DIRECTED MUTAGENESIS**

**Pavel D. Parshin¹, Ustina A. Martysuk², Denis L. Atroshenko^{1, 3}, Anna V. Popina-
ko³, Svyatoslav S. Savin^{1, 3}, Evgeny V. Pometun⁴, Vladimir I. Tishkov^{1, 3}, Anastasia
A. Pometun^{1, 3}**

¹ M.V. Lomonosov Moscow State University, Department of Chemistry, Moscow, Russian Federation

² D.M. Mendeleev University of Chemical Technology, Moscow, Russian Federation

³ A.N. Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Centre “Fundamentals of Biotechnology” of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

⁴ Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation

Corresponding authors: Vladimir I. Tishkov, vitishkov@gmail.com; Anastasia A. Pometun, aapometun@gmail.com

Abstract. Phenylacetone monooxygenase from *Thermobifida fusca* (EC 1.14.13.92, PAMO) is a part of Baeyer–Villiger monooxygenases family. It catalyzes oxidation of different aromatic ketones to corresponding esters using NADPH as cofactor. In present work we analyzed cofactor-binding center, selected residues which are potentially important for recognition of 2'-phosphate group, followed by modeling amino acid substitutions which could result in change of the enzyme cofactor specificity from NADPH to NADH. As result of modeling the next amino acid changes were proposed – T218D, T218E, K336A, K336R. Plasmids with genes of PAMO with proposed mutations were prepared by site-directed mutagenesis. Mutant enzymes were expressed, purified and characterized. New mutant PAMOs bound NADH but they did not catalyzed benzyl acetone oxidation in presence of NADH and showed worse K_M values with NADPH. Values of catalytic constants of mutant enzymes are slightly lower compared to wild type enzyme but deviations are in the range of experimental errors.

Keywords: phenylacetone monooxygenase, Baeyer–Villiger monooxygenase, protein engineering, site-directed mutagenesis, coenzyme specificity

Financial Support. The research was carried out with partial financial support from the Russian Foundation for Basic Research within the framework of scientific project No. 20-34-90120. During the research, the equipments of the Center for Collective Use “Genome” of the V.A. Engelhardt Institute of Molecular Biology of the Russian Academy of Sciences and the Center for Collective Use “Industrial Biotechnologies” of the Federal State Institution “Federal Research Center “Fundamentals of Biotechnology” of the Russian Academy of Sciences” were used.

For citation: Parshin P.D., Martysuk U.A., Atroshenko D.L., Popinako A.N., Savin S.S., Pometun E.B., Tishkov V.I., Pometun A.A. Study of Mechanism of Coenzyme Specificity of Phenylacetone Monooxygenase from *Thermobifida fusca* by Site-Directed Mutagenesis // Vestn. Mosk. un-ta. Ser. 2. Chemistry. T. 63. N 5. S. 334–343.

Список сокращений: ИПТГ – изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид; FDH – формиатдегидрогеназа; РАМО – фенилацетонмонооксигеназа из *Thermobifida fusca*.

Для биотехнологических процессов с участием оксидоредуктаз в качестве источника энергии используют в большом количестве дорогостоящие восстановленные формы никотинамидных кофакторов NADH и NADPH. Несмотря на то, что единственным структурным различием NADPH и NADH является наличие в первом кофакторе фосфатной группы, большинство ферментов обладают очень высокой (часто абсолютной) коферментной специфичностью к одному из них. Исследование механизма такой специфичности представляет само по себе важную и интересную фундаментальную задачу. Решение этой задачи имеет также очень большое практическое значение, поскольку при рассмотрении возможности реализации промышленных процессов наиболее предпочтительной формой является более дешевый и стабильный NADH.

Решающим этапом в реализации процессов хирального синтеза с помощью NAD(P)⁺-зависимых дегидрогеназ стало введение в процесс второй реакции, в результате которой окисленная форма кофермента вновь переходит в восстановленную [1]. Показано, что наиболее оптимальным ферментом для регенерации NADH является формиатдегидрогеназа (FDH) из метанолутилизирующих микроорганизмов [2, 3]. В то же время в силу физиологической роли NADPH именно в реакциях биосинтеза *in vivo* процессы с его участием представляют большой интерес. Однако эти процессы долгое время не осуществлялись, поскольку не были известны NADP⁺-специфичные FDH. Первые процессы хирального синтеза с помощью оксидоредуктаз и регенерации NADPH были описаны только в середине 90-х годов прошлого века [4, 5] после того, как в нашей лаборатории был получен первый вариант мутантной FDH из бактерий *Pseudomonas* sp.101 (PseFDH) с измененной специфичностью от NAD⁺ к NADP⁺ [6]. Позднее были получены мутантные NADP⁺-специфичные PseFDH с улучшенными катали-

тическими свойствами и стабильностью [7–11]. Эти ферменты использовали в ряде процессов хирального синтеза, включая процессы, катализируемые монооксигеназами Байера–Виллигера [12]. В настоящее время для снижения себестоимости биокаталитического синтеза в основном используют изменение коферментной специфичности практически важных оксидоредуктаз от NADP⁺ к NAD⁺. В литературе можно найти успешные примеры такого изменения методом направленного мутагенеза. Так, введение двух аминокислотных замен K21A/N272D позволило получить NADH-специфичную ксилоредуктазу, в то время как фермент дикого типа использует в качестве переносчика электронов исключительно NADPH [13].

Фенилацетонмонооксигеназа из *Thermobifida fusca* (КФ 1.14.13.92, РАМО) является термостабильной монооксигеназой Байера–Виллигера первого типа. Она содержит в активном центре FAD и катализирует реакции окисления ароматических кетонов до сложных эфиров [14]. РАМО, как и большинство монооксигеназ Байера–Виллигера первого типа, использует в качестве кофактора NADPH и проявляет значительно меньшую активность с NADH. Исключением из этой закономерности является фермент MекА из *Pseudomonas veronii* MEK700, который обладает сравнимыми константами Михаэлиса по NADPH (29 мкМ) и NADH (11 мкМ) [15]. Работы по изменению коферментной специфичности проводили на нескольких ферментах данного семейства. В работе, посвященной 4-гидроксиацетофенонмонооксигеназе (НАРМО), показано, что замена аминокислотного остатка лизина в 439 положении (соответствует K336 в РАМО), находящегося в непосредственной близости к фосфатной группе NADPH в центре связывания кофермента, на остаток фенилаланина и аланина приводит к ухудшению каталитических свойств фермента в реакции с NADPH и улучшению в реакции с NADH. Также установлено, что любые замены канонического остатка

аргинина (R339 в НАРМО, R217 в РАМО), координирующего фосфатную группу NADPH, приводят к значительному ухудшению всех свойств фермента [16].

В работе [17] изучены аминокислотные замены S208D/E, Q210N/S, K326H/N, K349R, L55R, S186P, T187L, W490Y, которые привели к улучшению свойств циклогексанонмонооксигеназы из *Acinetobacter sp.* NCIMB 9871 (СНМО_{Acineto}). Многие из этих остатков присутствуют в структуре РАМО и находятся в непосредственной близости от центра связывания NADPH.

Анализ структуры кофермент-связывающего домена активного центра РАМО позволил выявить участие остатка T218 в связывании фосфатной группы NADPH. Его замена на остаток аланина приводит к увеличению каталитической константы фермента в реакции с NADH, однако константа Михаэлиса также увеличивается [18]. Установлено, что замены H220N/Q приводят к значительному уменьшению константы Михаэлиса по NADH, а в случае замены H220N увеличивается и каталитическая константа. Мутация K336N не вызывает положительных эффектов, хотя аналогичная замена приводит к шестикратному увеличению эффективности НАРМО с NADH.

В настоящей работе продолжены эксперименты по исследованию механизма коферментной специфичности РАМО. Проведен анализ структуры активного центра фермента и с учетом результатов предыдущих работ предложены новые

перспективные замены. Проведено моделирование возможного влияния выбранных замен, получены генетические конструкции, содержащие гены, кодирующие мутантные РАМО с этими заменами. Соответствующие ферменты получены, очищены и изучены.

Экспериментальная часть Компьютерное моделирование

Анализ структуры и моделирование мутантных вариантов РАМО проводили с помощью программы UCSF Chimera [19], используя структуру фермента со связанным коферментом (PDBID 2YLR, 2YM1, 2YM2). Замены боковых радикалов аминокислот проводили, используя библиотеку различных конформаций боковых радикалов (ротамеров). Ротамеры были выбраны автоматически. Основные критерии отбора следующие: минимизация стерического напряжения, увеличение энергии водородных связей, соответствие конформациям боковых радикалов из библиотеки. Для оптимизации структурных моделей мутантов была проведена минимизация энергии с использованием подпрограммы минимизации UCSF Chimera без фиксации каких-либо атомов в системе.

Проведение реакции направленного мутагенеза

В качестве матрицы для получения генетических конструкций использовали ген *rato* из *T. fusca*, содержащий дополнительную

Т а б л и ц а 1

Нуклеотидные последовательности используемых в работе праймеров

Праймер	Нуклеотидная последовательность
РАМО_HisFor	5'- GCA TAG AGC CAT GGG TCA CCA CCA CCA CCA CCA TTC GGG TGC CGG GCA GAC GAC TG-3'
РАМО_Rev	5'-GGC CCA AGC TTT TAC TAG GTG AGG ACG AAA CCT TCG TAG CC-3'
T218D for	5'- TTC CAG CGC GAT CCC CAC TTT GCC GT-3'
T218D_rev	5'- CAA AGT GGG GAT CGC GCT GGA ACA CG-3'
T218E_for	5'- TTC CAG CGC GAA CCC CAC TTT GCC GT-3'
T218E_rev	5'- CAA AGT GGG GTT CGC GCT GGA ACA C-3'
K336A_for	5'- TTC GGC ACC GCG CGC CTC ATC CTG -3'
K336A_rev	5'- GGA TGA GGC GCG CGG TGC CGA AC -3'
K336R_for	5'- TTC GGC ACC CGT CGC CTC ATC CTG -3'
K336R_rev	5'- GGA TGA GGC GAC GGG TGC CGA ACG -3'

нуклеотидную последовательность, кодирующую 6 остатков гистидина на N-конце [20]. Все конструкции созданы на базе вектора серии pET28a(+). Введение необходимых нуклеотидных замен проводили с помощью двустадийной полимеразной цепной реакции с использованием праймеров, представленных в табл. 1.

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили на амплификаторе «Т 100 Thermal Cycler» («Bio-Rad»). К раствору смеси праймеров (20 пкмоль каждого) добавляли 2,5 мкл 10-кратного буфера для ПЦР, поставляемого фирмой-производителем вместе с ферментом, 1 мкл раствора $MgCl_2$ (25 мМ), 2 мкл раствора dNTP (2,5 мМ каждого), 1 мкл раствора геномной ДНК (50 нг/мкл), 0,5 мкл Phusion ДНК-полимеразы («ThermoFisher Scientific», 5 ед./мкл) и 17 мкл деионизованной воды до общего объема 25 мкл. ПЦР проводили по следующей схеме: 30 циклов (10 с при 98 °С; 10 с при 72 °С; 1,5 мин при 72 °С), далее элонгация 10 мин при 72 °С.

Продукты ПЦР очищали электрофорезом в 1%-м агарозном геле и обрабатывали эндонуклеазами рестрикции NcoI и HindIII. Затем ДНК очищали электрофорезом в 1%-м агарозном геле и лигировали с расщепленной теми же эндонуклеазами рестрикции плазмидой pET28a(+). После лигирования реакционной смесью трансформировали клетки *E. coli* DH5α и высевали их на чашки Петри с агаризованной средой, содержащей канамицин (30 мкг/мл), и выдерживали 16 ч при 37 °С. Для каждой конструкции с чашки брали по три колонии, из которых выделяли плазмиды. Для контроля полученных конструкций проводили секвенирование плазмидной ДНК в Центре коллективного пользования «Геном» (Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН).

Экспрессия мутантных РАМО в клетках *E. coli*

Для экспрессии ферментов проводили трансформацию плазмидной ДНК в штамм *E. coli* BL21(DE3). Колонии клеток штамма-продуцента помещали в 4 мл среды LB, содержащей 30 мкг/мл канамицина, и культивировали в течение ночи при 37 °С и 180 об/мин. Клетки из ночной культуры пересевали в 200 мл свежей среды TB (дрожжевой экстракт 24 г/л; бактотриптон 24 г/л; глицерин 4 мл/л; 0,017 М KH_2PO_4 ; 0,072 М KH_2PO_4 ; pH 7,0) с аналогичной концентрацией канамицина до поглощения

$A_{600} = 0,08-0,10$. Клетки растили при 120 об/мин и 37 °С. По достижении поглощения $A_{600} = 0,8$ добавляли 200 мкМ ИПТГ. Экспрессию проводили в течение 24 или 7 ч при 120 об/мин и разной температуре (30 или 37 °С). Клетки осаждали центрифугированием в течение 20 мин при 6000 об/мин и 4 °С. Осадок ресуспендировали в охлажденном буфере, содержащем 50 мМ Tris-HCl; 500 мМ NaCl и 20 мМ имидазол; pH 7,5.

Выделение и очистка

К суспензии клеток добавляли водный раствор FAD до конечной концентрации 10 мкМ. Разрушение клеток проводили ультразвуком в течение 4–5 циклов по 90 с во льду с перерывами на охлаждение. Далее раствор инкубировали при 55 °С в течение 10 мин с последующим осаждением дебриса на центрифуге (40 мин, 10 000 об/мин, 4 °С). Бесклеточный экстракт наносили на колонку HisTrap HP объемом 1 мл, заполненную буферным раствором, содержащим 50 мМ Tris-HCl, 500 мМ NaCl, 20 мМ имидазол (pH 7,5), и смывали возрастающим линейным градиентом концентрации имидазола от 20 до 500 мМ. Фракции, содержавшие целевой белок, переводили в 50 мМ натрий-фосфатный буферный раствор (pH 7,5) с помощью гель-фильтрации через Сефадекс G-25. За эффективностью очистки следили методом белкового электрофореза в денатурирующих условиях.

Определение каталитических параметров

Раствор РАМО перед измерением инкубировали при 55 °С в течение 10 мин. За протеканием реакции следили при 30 °С по расходу NADPH, измеряя уменьшение поглощения при 340 нм. Объем реакционной среды составлял 1 мл. Для измерений использовали 50 мМ натрий-фосфатный буфер (pH 7,5), содержащий 50 мкМ NADPH и 10 мМ бензилацетона. Для определения констант Михаэлиса концентрацию NADPH и бензилацетона варьировали в диапазоне 5–500 мкМ и 0,25–15 мМ соответственно. Значения K_M были рассчитаны по экспериментальным зависимостям скорости реакции от концентрации вартируемого субстрата методом нелинейной регрессии с помощью программы Origin Pro 8.5. Концентрацию активных центров фермента определяли спектрофотометрически по поглощению FAD на 441 нм ($\varepsilon = 12,4 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$).

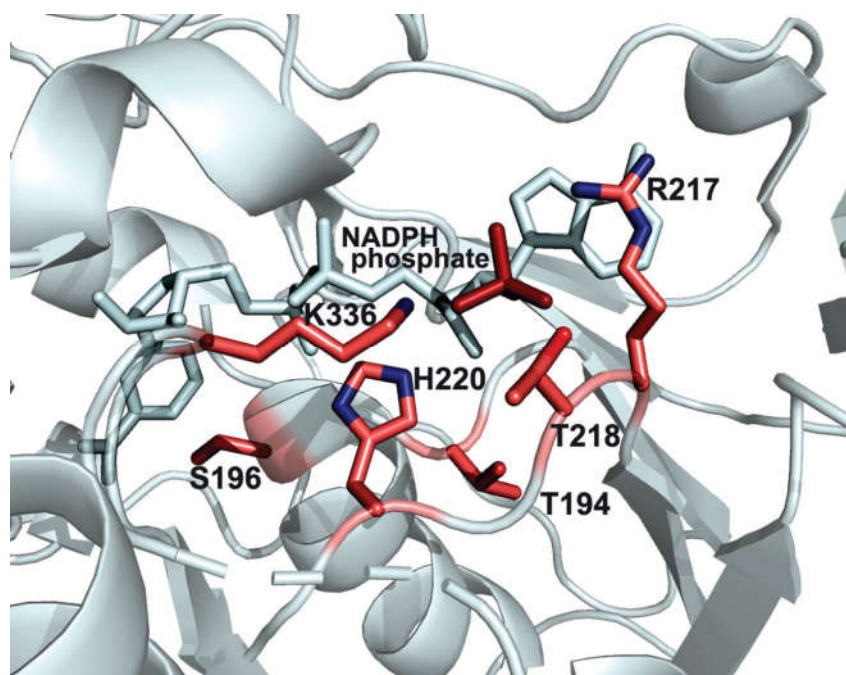


Рис. 1. Структура участка кофермент-связывающего домена активного центра РАМО и положение ряда аминокислотных остатков в области связывания фосфатной группы

Результаты и обсуждения

Моделирование аминокислотных замен

По результатам анализа литературы и детального изучения структуры активного центра фенилацетонмонооксигеназы на основе имеющихся в базе данных PDB структур фермента в комплексе с NADPH (PDBID 2YLR, PDBID 2YM2, PDBID 2YM1) были отобраны аминокислотные остатки H220, T218, T194, K336, и R217 (рис. 1). Замены остатка H220 уже описаны в литературе, а остаток R217 играет важную роль в катализе [21], поэтому его замена не является целесообразной. Аминокислотные остатки T194 и S196 находятся на большем удалении от фосфатной группы NADPH. Поэтому в первую очередь было изучено влияние аминокислотных замен остатков T218 и K336.

Моделирование показало, что в случае аминокислотного остатка треонина наибольшее воздействие на центр связывания кофермента должны оказывать замены T218D и T218E (рис. 2, А). Выбор этих аминокислотных замен обусловлен стерическими затруднениями, возникающими вблизи фосфатной группы рибозы NADPH, которые могут препятствовать связыванию фосфорилированной формы кофактора и облегчать связывание NADH.

Аналогично (исходя из предположения о возникающих стерических затруднениях при связывании NADPH) была выбрана аминокислотная замена K336R (рис. 2, Б). Вводимый остаток аргинина заряжен положительно, как и остаток лизина. Поскольку это может благоприятно влиять на связывание фосфатной группы кофермента, было интересно получить вариант фермента с коротким незаряженным хвостом. По этой логике была сделана замена K336A.

Для верификации правильности выбора ключевых аминокислотных остатков мы сравнили результаты нашего анализа с предсказанием, выполненным сервером CSR-Salad (Cofactor Specificity Reversal Structural Analysis & Library Design, <http://www.che.caltech.edu/groups/fha/CSRSALAD/index.html>) с использованием структуры РАМО PDB2YLR. Показано, что ключевыми для проявления коферментной специфичности являются остатки R217, T218, H220 и K336. Этот же сервер предлагает возможные замены. В случае остатка H220 никаких замен предложено не было, хотя в работе [18] показано положительное влияние замен H220N и H220Q на каталитическую активность РАМО с NADH. Остаток R217 следует рассматривать отдельно, поскольку ранее проведенные эксперименты [20] показали, что этот остаток нельзя подвергать мутации, так как он является каноническим для монооксигеназ.

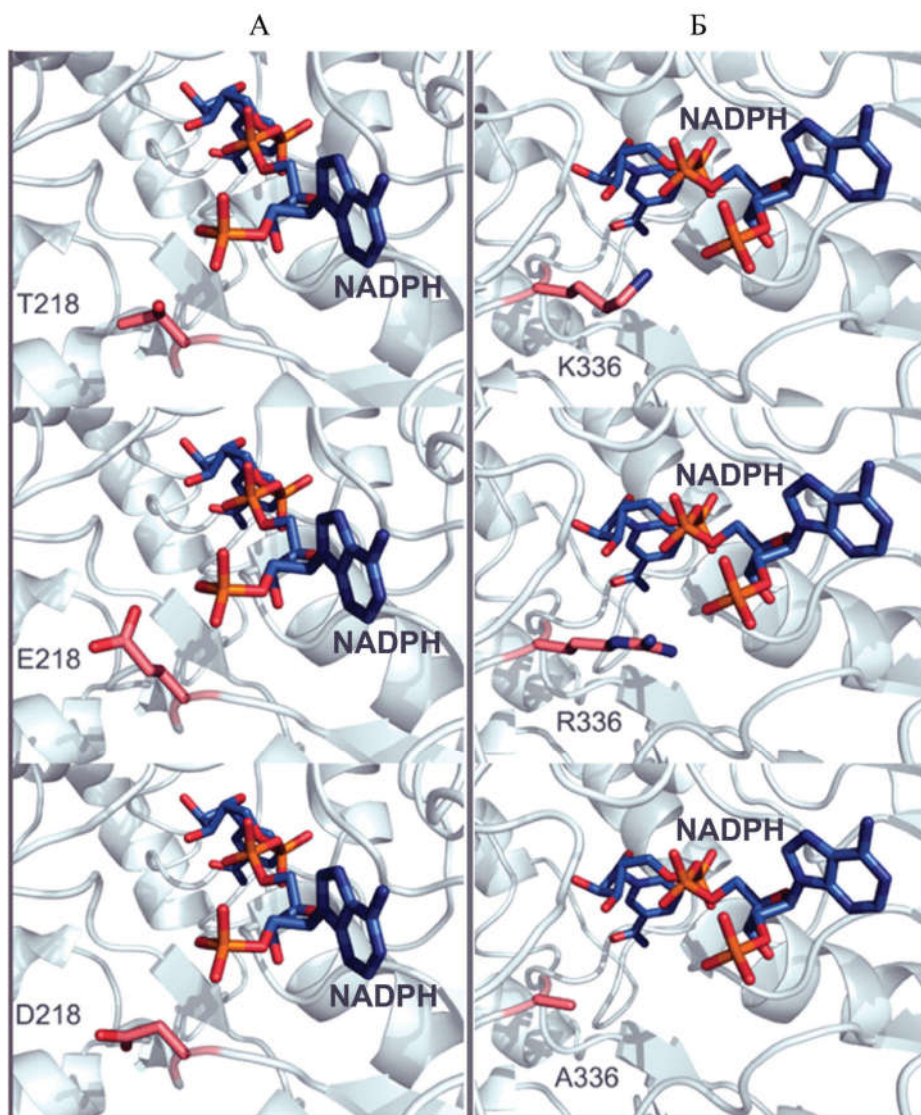


Рис. 2. Структуры фрагмента активного центра фенилацетонмонооксигеназы вблизи молекулы NADPH для фермента дикого типа (T218, K336), а также модельные структуры для ферментов с аминокислотными заменами T218E и T218D (А), K336R и K336A (Б)

Получение и изучение мутантных вариантов РАМО

Экспрессию полученных генетических конструкций осуществляли по стандартной методике. Оптимизация условий экспрессии фенилацетонмонооксигеназы проводилась нами ранее на этапе изучения влияния гистидиновой метки [13]. Наличие последовательности His-tag на N-конце всех исследуемых вариантов РАМО позволяет использовать для очистки метод металл-хелатной хроматографии. Чистоту полученных препаратов контролировали с помощью аналитического гель-электрофореза в денатурирующих условиях. Как показано на рис. 3, все ферменты были получены практически в гомогенном виде. В табл. 2 представлены каталитические параметры полученных ферментов в сравнении с фер-

ментом дикого типа. Из данных табл. 2 видно, что введение выбранных аминокислотных замен приводит к небольшому ухудшению констант Михаэлиса по NADPH, что свидетельствует об ухудшении связывания этого кофермента. При изучении процесса конверсии бензилацетона мутантными формами РАМО в реакции с NADH детектируется уменьшение концентрации восстановленной формы кофермента, что указывает на появление способности связывать NADH. Тем не менее, аналогичная скорость расхода NADH детектируется при любой стартовой концентрации бензилацетона, а также без добавления бензилацетона в реакционную среду. Это означает, что процесс конверсии бензилацетона отсутствует. Этот эффект расходования кофермента «вхолостую» – достаточно

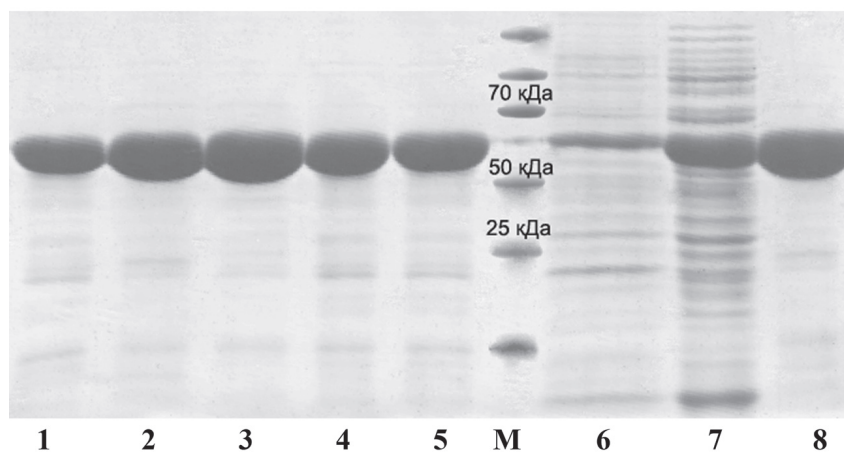


Рис. 3. Результаты очистки РАМО и его мутантных форм. 1 – РАМО, 2 – РАМО T218D, 3 – РАМО T218E, 4 – РАМО K336R, 5 – РАМО K336A, 6–8 – фракции РАМО T218D на разных этапах очистки (6 – через два часа после индукции, 7 – в конце культивирования до аффинной хроматографии, 8 – после аффинной хроматографии), М – маркер молекулярной массы

Т а б л и ц а 2

Каталитические характеристики мутантных вариантов РАМО

Фермент	$k_{\text{кат}}, \text{с}^{-1}$	$K_M^{\text{NADPH}}, \text{мкМ}$	$A^{\text{NADPH}}/A^{\text{NADH}}$
РАМО	$1,5 \pm 0,3$	$3,2 \pm 0,4$	33 ± 3
РАМО T218D	$0,8 \pm 0,3$	21 ± 2	25 ± 2
РАМО T218E	$1,1 \pm 0,3$	10 ± 1	20 ± 2
РАМО K336R	$0,6 \pm 0,2$	25 ± 2	28 ± 2
РАМО K336A	$0,7 \pm 0,3$	19 ± 2	23 ± 2

распространенная проблема для монооксигеназ [21, 22].

Результаты наших экспериментов вместе с данными других авторов свидетельствуют, что кардинальное изменение коферментной специфичности РАМО с NADP^+ к NAD^+ не может быть достигнуто за счет единичных аминокислотных замен. Проблема скорее всего может быть решена с помощью нескольких одновременных замен. Перед этим необходимо проведение комплексного моделирования влияния нескольких замен на структуру активного центра, что и запланировано сделать далее.

Результаты, полученные в настоящей работе с РАМО, полностью согласуются с общей закономерностью: изменение коферментной специфичности фермента с NADP^+ к NAD^+ представляет собой намного более сложную проблему, чем обратная процедура. Ярким примером служит первая успешная работа по изменению коферментной специфичности глутатионредуктазы

(GTR) от NADPH к NADH [23]. Кофермент-связывающий домен этого фермента имеет очень высокую гомологию с NAD^+ -специфичной дигидролипоамиддегидрогеназой (DHLDH). Только благодаря такой гомологии авторам удалось идентифицировать ряд ключевых остатков, которые подвергли направленному мутагенезу: третий остаток аланина в канонической последовательности GxGxxG(A) – Ala179 был заменен на остаток Gly, остаток Arg198, взаимодействующий с 2'-фосфатом кофермента, заменили на остаток Met, а в остаток 197 ввели мутацию Val197Glu для создания водородных связей между боковой карбоксильной группой остатка Glu и OH-группами рибозы. Однако заметного улучшения каталитических свойств не наблюдалось. В результате ввели дополнительно куски аминокислотной последовательности из активного центра DHLDH в кофермент-связывающий домен GTR. Только после таких комплексных (точечных и линейных) замен удалось получить

мутантный фермент, который был в 71,8 раза более специфичен к NADH, чем к NADPH, однако его каталитическая эффективность ($k_{\text{кат.}}/K_M$) с

мутантной GTR с NADH была более чем в 30 раз хуже по сравнению с таковой с NADPH для фермента дикого типа.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wichmann R., Wandrey C., Bückmann A.F., Kula M.R. // *Biotechnol. Bioeng.* 1982. Vol. XXIII. N 12. P. 2789–2802.
2. Van Der Donk W.A., Zhao H. // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2003. Vol. 14. N 4. P. 421–426.
3. Тишков В.И. // *Вестн. Моск. Унив. Сер. 2. Химия.* 2002. Т. 43. № 6. С. 380–387.
4. Seelbach K., Riebel B., Hummel W., Kula M.R., Tishkov V.I., Egorov A.M., Wandrey C., Kragl U. // *Tetrahedron Lett.* 1996. Vol. 37. N 9. P. 1377–1380.
5. Rissom S., Schwarz-Linek U., Vogel M., Tishkov V.I., Kragl U. // *Tetrahedron: Assymetry.* 1997. Vol. 8. N 15. P. 2523–2526.
6. Tishkov V.I., Galkin A.G., Egorov A.M. // *Materials of International Conference “Enzyme Engineering XII.”*, Deu Ville, France, 1993.
7. Tishkov V.I., Galkin A.G., Fedorchuk V. V., Savitsky P.A., Rojkova A.M., Gieren H., Kula M. // *Biotechnol. Bioeng.* 1999. Vol. 64. N 2. P. 187–193.
8. Serov A.E., Popova A.S., Fedorchuk V. V., Tishkov V.I. // *Biochem. J.* 2002. Vol. 367. P. 841–847.
9. Tishkov V.I., Popov V.O. // *Biomol. Eng.* 2006. Vol. 23. N 2–3. P. 89–110.
10. Alekseeva A.A., Fedorchuk V. V., Zarubina S.A., Sadykhov E.G., Matorin A.D., Savin S.S., Tishkov V.I. // *Acta Naturae.* 2015. Vol. 7. N 1. P. 60–69.
11. 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. 250–257.
12. Schwarz-Linek U., Krödel A., Ludwig F.-A., Schulze A., Rissom S., Kragl U., Tishkov V.I., Vogel M. // *Synthesis (Stuttg).* 2001. Vol. 33. N 6. P. 947–951.
13. Zeng Q.K., Du H.L., Wang J.F., Wei D.Q., Wang X.N., Li Y.X., Lin Y. // *Biotechnol. Lett.* 2009. Vol. 31. N 7. P. 1025–1029.
14. Fraaije M.W., Wu J., Heuts D.P.H.M., Van Hellemond E.W., Spelberg J.H.L., Janssen D.B. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2005. Vol. 66. N 4. P. 393–400.
15. Völker A., Kirschner A., Bornscheuer U.T., Altenbuchner J. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2008. Vol. 77. N 6. P. 1251–1260.
16. Kamerbeek N.M., Fraaije M.W., Janssen D.B. // *Eur. J. Biochem.* 2004. Vol. 271. N 11. P. 2107–2116.
17. Beier A., Bordewick S., Maika G., Schmidt S., Bergh T. van den, Peters C., Joosten H., Bornscheuer U.T. // *ChemBioChem.* 2016. Vol. 17. N 24. P. 2312–2315.
18. Dudek H.M., Torres Pazmiño D.E., Rodríguez C., De Gonzalo G., Gotor V., Fraaije M.W. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2010. Vol. 88. N 5. P. 1135–1143.
19. Pettersen E.F., Goddard T.D., Huang C.C., Couch G.S., Greenblatt D.M., Meng E.C., Ferrin T.E. // *J. Comput. Chem.* 2004. Vol. 25. N 13. P. 1605–1612.
20. Parshin P.D., Pometun A.A., Martysuk U.A., Kleymentov S.Y., Atroshenko D.L., Pometun E. V., Savin S.S., Tishkov V.I. // *Biochemistry (Mosc.).* 2020. Vol. 85. N 5. P. 575–582.
21. Balke K., Beier A., Bornscheuer U.T. // *Biotechnol. Adv.* 2018. Vol. 36. P. 247–263.
22. Kokorin A., Parshin P.D., Bakkes P.J., Pometun A.A., Tishkov V.I., Urlacher V.B. // *Sci. Reports* 2021. Vol. 11. P. 21706.
23. Scrutton N.S., Berry A., Perham R.N. // *Nature* 1990. Vol. 34. P. 38–43.

Информация об авторах

Паршин Павел Дмитриевич – мл. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, parshin.p04@gmail.com;

Мартысюк Устина Александровна – студентка Российского химико-технологического университета имени Д.И. Менделеева, ustina-m@mail.ru;

Атрошенко Денис Леонидович – мл. науч. сотр. лаборатории молекулярной инженерии Института биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, канд. хим. наук, atrdenis@gmail.com;

Попинако Анна Владимировна – науч. сотр. группы молекулярного моделирования Института биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, канд. биол. наук, ropinakoav@gmail.com;

Савин Святослав Сергеевич – ст. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, науч. сотр. лаборатории молекулярной инженерии Института биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, канд. биол. наук, savinslava@gmail.com;

Пометун Евгений Владимирович – доцент кафедры аналитической, физической и коллоидной химии Института фармации ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), канд. хим. наук, epometun@gmail.com;

Тишков Владимир Иванович – профессор химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, зав. лабораторией молекулярной инженерии Института биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, докт. хим. наук, профессор, vitishkov@gmail.com;

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. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, докт. хим. наук, aapometun@gmail.com.

Вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила в редакцию 16.03.2022;
одобрена после рецензирования 18.03.2022;
принята к публикации 14.04.2022.