

УДК 66.047

ВЛИЯНИЕ N-КОНЦЕВОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ НА УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ И СВОЙСТВА ФОРМИАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ИЗ БАКТЕРИЙ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS***Т.С. Юрченко¹, А.А. Логинова¹, И.Е. Сычева¹, А.А. Пометун^{1,2}, С.С. Савин¹, В.И. Тишков^{1,2}**¹ Химический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия;² Институт Биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

NAD(P)[±]зависимая формиатдегидрогеназа (КФ 1.2.1.2, ФДГ) катализирует реакцию окисления формиат-иона до углекислого газа с сопряженным восстановлением NAD⁺ до NADH. Данный фермент является гомодимером, не содержит ионов металлов и других простетических групп.

В отличие от большинства органических и неорганических катализаторов, ферменты обладают высокой специфичностью к субстрату и высокой каталитической эффективностью. Это и обуславливает их активное применение при производстве лекарственных препаратов, где требуется получить лишь один из энантиомеров. Однако для экономически выгодного получения подобных лекарственных препаратов с применением стереоспецифических ферментов необходимы дорогостоящие восстановленные никотиамидные кофакторы NADH или NADPH. Данная проблема решается использованием ферментативных систем, где второй фермент выступает в качестве катализатора регенерации NAD(P)H. Формиатдегидрогеназа благодаря низкой стоимости субстрата (HCOO⁻) и летучести реакционного продукта, не требующего дополнительной очистки, выгодно выделяется на фоне других ферментов с аналогичной функцией. Это объясняет интерес к данному ферменту на протяжении длительного времени, о чем свидетельствует поиск все новых ФДГ из различных источников.

Данная работа является продолжением систематического исследования рекомбинантных ФДГ. Объектом данного исследования является ФДГ из патогенных бактерий *Staphylococcus aureus*. Эксперименты в нашей лаборатории показали, что эта ФДГ обладает самым высоким значением каталитической константы относительно всех описанных формиатдегидрогеназ из других источников и выдающейся температурной стабильностью, что является несомненным плюсом для использования фермента в биотехнологии. Недостатком данного фермента являются высокие значения констант Михаэлиса. В предыдущих исследованиях было показано, что возможны два варианта аннотации гена ФДГ в геноме золотистого стафилококка. Поэтому ранее в нашей лаборатории были сконструированы плазмиды, кодирующие разные возможные варианты гена ФДГ – длинную SauFDH1 и укороченную SauFDH2. Однако при экспрессии в клетках *E. coli* было установлено, что для обеих плазмид получаются ферменты, которые обладают одинаковой молекулярной массой, соответствующей короткой форме. Точное соответствие продуктов экспрессии короткой форме SauFDH2 было также подтверждено с помощью тандемной MALDI/TOF/TOF масс-спектрометрии.

С целью выявить причины, по которым обе формы гена при экспрессии в клетках *E. coli* дают белок, соответствующий короткой форме SauFDH2, были получены мутантные формы с точечными заменами M34A, K35A, D33N/M34A, M34G/K35Q. Также были введены молчащие замены S2, S2/K22/L29/G30 и делеция рибосом-связывающего сайта (noRBS1) плазмидного вектора. Замены M34A, D33N+M34A и noRBS1 приводят к отсутствию экспрессии любой из форм SauFDH. Вероятно, данные остатки играют важную роль в экспрессии нашего фермента. Для мутантных форм S2, K35A, M34G/K35Q, S2/K22/L29/G30 (noRBS2) наблюдается уменьшение содержания целевого белка. Были исследованы каталитические свойства мутантных форм с заменами K35A, S2 и noRBS2. В каждом из этих случаев было показано снижение $K_M^{\text{HCOO}^-}$ – примерно в 2 раза по сравнению с ферментом дикого типа. $K_M^{\text{NAD}^+}$ практически не изменилась.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, грант 20-04-00915.