НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

УДК 577.151

ИНЖЕНЕРИЯ N-КОНЦЕВОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ФОРМИАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ИЗ СОИ *GLYCINE MAX*

Леонид Александрович Шапошников[1], Святослав Сергеевич Савин[1], Денис Леонидович Атрошенко[1, 2], Татьяна Анатольевна Чубарь[1], Евгений Владимирович Пометун[3], Владимир Иванович Тишков[1, 2], Анастасия Александровна Пометун[1, 2]

[1] Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет
[2] Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук
[3] Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет)

Авторы, ответственные за переписку: Анастасия Александровна Пометун, aapometun@gmail.com; Владимир Иванович Тишков, vitishkov@gmail.com

Аннотация. NAD(P)$^+$-зависимая формиатдегидрогеназа (FDH, КФ 1.2.1.2.) катализирует окисление формиат-иона при сопряженном восстановлении NAD(P)$^+$ до NAD(P)H. Ранее в нашей лаборатории была получена генетическая конструкция с геном *soyfdh2*, кодирующим изофермент 2 формиатдегидрогеназы из сои *Glycine max* (SoyFDH), в котором была удалена нуклеотидная последовательность, кодирующая сигнальный пептид, отвечающий за транспорт профермента в митохондрии клеток растений (фермент SoyFDH_L). В настоящей работе получен второй вариант SoyFDH_S, в котором по сравнению с SoyFDH_L последовательность на N-конце была уменьшена и изменена в целях получения начального участка, соответствующего последовательности N-конца в FDH из бактерий *Pseudomonas* sp.101. Далее на N-конец этой и укороченной форм SoyFDH была добавлена последовательность из шести остатков гистидина (His-tag). Все четыре варианта SoyFDH были экспрессированы в клетках *E. coli* BL21(DE3)CodonPlus, проведена очистка этих ферментов, определены их кинетические параметры и исследована термостабильность. Показано, что в случае SoyFDH_L, аналогичной природному варианту фермента, как с His-tag, так и без него уровень экспрессии выше в два раза по сравнению с укороченным вариантом. Добавление His-tag на N-конец ферментов снижает уровень экспрессии. Изменение последовательности N-конца, а также введение на N-конец последовательности His-tag не оказывает значительного влияния на термостабильность при температуре 50–56 °C, однако за счет более высоких значений энтальпии активации процесса термоинактивации укороченная форма при нормальных значениях температуры стабильнее природной в 3 раза. Сравнение кинетических параметров двух вариантов SoyFDH показывает, что каталитические константы одинаковы, но длинный вариант SoyFDH_L имеет более низкие значения $K_M^{HCOO^-}$, а короткий – более низкие значения $K_M^{NAD^+}$. Введение His-tag на N-конец ферментов не оказывает влияния на их кинетические параметры.

Ключевые слова: формиатдегидрогеназа, *Glycine max*, белковая инженерия, каталитические параметры, температурная стабильность

© Шапошников Л.А., Савин С.С., Атрошенко Д.Л., Чубарь Т.А., Пометун Е.В., Тишков В.И., Пометун А.А., 2023

DOI: 10.55959/MSU0579-9384-2-2023-64-3-377-390

Список сокращений: FDH – формиатдегидрогеназа, SoyFDH – изофермент 2 формиатдегидрогеназы из сои *Glycine max*, NAD^+ – никотинамидадениндинуклеотид, SoyFDH_L – длинный вариант фермента, SoyFDH_S – короткий вариант фермента, SoyFDH_L_His и SoyFDH_S_His – соответственно длинный и укороченные варианты с His-tag на N-конце, NaPB – натрий-фосфатный буфер.

Финансирование. Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 21-34-70046 и частично в рамках государственного научного задания.

Для цитирования: Шапошников Л.А., Савин С.С., Атрошенко Д.Л., Чубарь Т.А., Пометун Е.В., Тишков В.И., Пометун А.А. Инженерия N-концевой последовательности формиатдегидрогеназы из сои *Glycine max* // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2023. Т. 64. № 4. С. 377–390.

ORIGINAL ARTICLE

ENGINEERING THE N-TERMINAL SEQUENCE OF *GLYCINE MAX* SOYBEAN FORMATE DEHYDROGENASE

Leonid A. Shaposhnikov[1], Svyatoslav S. Savin[1], Denis L. Atroshenko[1], Tatyana A. Chubar[1], Evgenii V. Pometun[3], Vladimir I. Tishkov[1, 2], Anastasia A. Pometun[1, 2]

[1] Department of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation
[2] Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation
[3] Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation

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

Abstract. $NAD(P)^+$-dependent formate dehydrogenase (FDH, EC 1.2.1.2.) catalyzes the oxidation of formate ion with the coupled reduction of $NAD(P)^+$ to NAD(P)H. Previously, in our laboratory, a genetic construct was obtained with the *soyfdh2* gene encoding isoenzyme 2 of formate dehydrogenase from soybean *Glycine max* (SoyFDH). In this construct the nucleotide sequence encoding the signal peptide responsible for the transport of the pro-enzyme into the mitochondria of plant cells (the SoyFDH_L enzyme) was deleted. In this work, a second variant of SoyFDH_S was obtained, in which, compared to SoyFDH_L, the sequence at the N-terminus was reduced and changed to mimic the N-terminus sequence in FDH from *Pseudomonas* sp.101 bacteria. Next, a sequence of six histidine residues (His-tag) was added to the N-terminus of the long and short forms of SoyFDH. All four SoyFDH variants were expressed in *E. coli* BL21(DE3)CodonPlus, these enzymes were purified, their kinetic parameters were determined, and thermal stability was studied. In the case of SoyFDH_L, which is similar to the natural variant of the enzyme, both with and without His-tag, the expression level is two times higher compared to the truncated variant. The addition of His-tag to the N-terminus of enzymes reduces the level of expression. Changing the sequence of the N-terminus, as well as introducing the His-tag sequence to the N-terminus, does not significantly affect thermal stability of the enzymes at temperatures of 50–56 °C. However, due to the higher values of the activation enthalpy $\Delta H^{\neq}$ of the thermal inactivation process, the shortened form at normal temperatures is 3 times more stable than the natural one. A comparison of the kinetic parameters of the