

КОНСТРУИРОВАНИЕ ГЛИЦЕРАЛЬДЕГИД-3-ФОСФАТ ДЕГИДРОГЕНАЗЫ *ESCHERICHIA COLI* С ИЗМЕНЕННОЙ КОФАКТОРНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТЬЮ

Е. А. Сливинская, И. Б. Альтман, Т. А. Ямпольская

Закрытое акционерное общество «Научно-исследовательский институт Аджиномото-Генетика»
Поступила в редакцию 14.07.2014 г.

Аннотация. Глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа (ГАФДГ) является одним из ключевых ферментов центрального метаболизма клетки. У разных организмов выделяют три различных типа ГАФДГ в зависимости от субклеточной локализации и кофакторной специфичности. Гликолитический НАД⁺-зависимый фермент найден во многих организмах, включая *E.coli*. В данной работе кофакторная специфичность ГАФДГ *E.coli* была изменена путем замены нескольких аминокислот, образующих каталитический центр белка. Для получения мутантных генов *gapA* был использован случайный и сайт-направленный мутагенез. Среди мутантных ферментов были обнаружены белки с двойной НАД⁺/НАДФ⁺ кофакторной специфичностью и высоким уровнем дегидрогеназной активности.

Ключевые слова: глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа, НАД⁺, НАДФ⁺, кофакторная специфичность

Abstract: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases (GAPDH) is one of the key enzymes of cells central metabolism. Three distinct types of GAPDH enzymes are known in different organisms depending on sub-cellular localization and cofactor specificity. The first type of GAPDH is mainly a NAD⁺-dependent glycolytic enzyme found in numerous organisms including *E.coli*. In our work we modified the cofactor specificity of *E.coli* GAPDH by replacement of several amino acids involved into catalytic center of enzyme. Random and site-directed mutagenesis was used for mutagenesis of *gapA* gene. The analysis of GAPDH activity revealed the high active mutant enzymes with double NAD⁺/NADP⁺ cofactor specificity.

Keywords: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, NAD⁺, NADP⁺, cofactor specificity.

Необходимым условием эффективного ферментативного синтеза многих препаратов, таких как витамины, каротиноиды, антибиотики, является наличие в клетке достаточного количества НАДН и НАДФН в качестве кофакторов. Несмотря на то, что эти соединения участвуют в сходных биохимических реакциях, их метаболические роли различны: пара НАД⁺/НАДН принимает активное участие в катаболических и энергосинтезирующих реакциях окисления, в то время как НАДФ⁺/НАДФН в большей степени используется в биосинтетических анаболических процессах, выступая в роли переносчика электронов и поддерживая функциональность огромного числа ферментов, катализирующих реакции биосинтеза жирных кис-

лот, стероидов, аминокислот, пуринов и пиримидинов. Первичный метаболизм клетки может обеспечить достаточное количество обоих кофакторов, необходимых для роста, благодаря регенерации восстановительных эквивалентов. Однако в штаммах-продуцентах промышленных соединений уровень НАДФН может оказаться фактором, определяющим скорость биосинтеза целевого вещества [1]. Работы по исследованию кинетики метаболизма пиридиновых нуклеотидов в *Escherichia coli* показали, что отношение НАДФ⁺ к НАД⁺ в значительной степени зависит от скорости их взаимного превращения, обеспечиваемой протон-транспортной мембраносвязанной трансдигидрогеназой PntAB [2]. Главными источниками НАДФН в клетке являются НАДФ⁺-зависимые дегидрогеназы окислительной ветви пентозофосфатного пути (ПФП),

синтезирующие два моля НАДФН при утилизации одного моля глюкозы, а также изоцитратдегидрогеназа цикла трикарбоновых кислот. Из данных литературы известно несколько способов увеличения пула этого кофактора, как то: перенаправление главного углеродного потока глюкозо-6-фосфата из пути Эмбдена-Мейергофа-Парнаса (ЭМП) в ПФП вследствие инактивации фосфоглюкоизомеразы [3]; сверхэкспрессия генов, кодирующих НАДФ⁺-зависимую глюкозо-6-фосфат-1-дегидрогеназу и 6-фосфоглюконат-2-дегидрогеназу [4]; экспрессия в клетке гетерологичных генов, кодирующих НАДФ⁺-зависимые белки. Достаточно перспективным методом представляется замена кофакторной специфичности собственных НАДФ⁺-зависимых ферментов, катализирующих различные реакции, на НАДФ⁺-зависимую.

Одним из кандидатов для такого рода модификаций является глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа (ГАФДГ) - фермент центрального пути метаболизма углерода, катализирующий окисление D-глицеральдегид-3-фосфата (Г-3Ф). В настоящее время принято выделять три типа ГАФДГ с различной субклеточной локализацией и функцией в клетке. Наименее распространенный фермент, известный как цитозольная нефосфорилирующая НАДФ⁺-зависимая ГАФДГ (GapN) (EC 1.2.1.9, которую называют также фосфат-независимой глицеральдегид-3-фосфат:НАДФ⁺ оксидоредуктазой), был обнаружен в зелёных водорослях и некоторых штаммах *Streptococcus* [5]. Этот белок катализирует необратимое окисление Г-3Ф до 3-фосфоглицерата и характеризуется низкой специфической активностью.

Ферменты двух следующих классов относятся к фосфорилирующим ГАФДГ и используют неорганический фосфат в качестве субстрата в реакции обратимого окисления Г-3Ф до 1,3-дифосфоглицерата.

ГАФДГ второго типа, широко распространенные в природе так называемые фотосинтетические ГАФДГ, обнаружены в организмах с окислительным фотосинтезом, таких как цианобактерии, зелёные и красные водоросли и высшие растения [6]. Они локализуются в строме хлоропластов и вовлечены в фотосинтетическую ассимиляцию CO₂ в восстановительной ветви ПФП. К этому классу относятся ферменты преимущественно с двойной НАДФ⁺/НАДФ⁺-кофакторной специфичностью.

Третий тип ГАФДГ – это белки, локализующиеся в цитоплазме и играющие основную роль в гликолизе и глюконеогенезе. У большинства

микроорганизмов и, в частности, *Escherichia coli*, этот фермент использует в качестве кофактора НАД⁺ (EC 1.2.1.12). Однако сейчас обнаружены ГАФДГ третьего типа, имеющие двойную кофакторную специфичность, к примеру, ГАФДГ *Kluveromyces lactis* (EC 1.2.1.59) [7]. Некоторые организмы, такие как *Bacillus subtilis* и *Bacillus stearothermophilus*, имеют два изофермента ГАФДГ, GapA и GapB, вовлечённые в гликолиз и глюконеогенез соответственно, и использующие в качестве кофакторов НАД⁺ (EC 1.2.1.12) и НАДФ⁺ (EC 1.2.1.13) [8].

Аминокислотные последовательности гликолитических ГАФДГ отличаются высокой степенью консервативности. На основе анализа ферментов с разной кофакторной специфичностью рядом авторов были определены основные локусы, отвечающие за взаимодействие белковой молекулы с НАД⁺/НАДФ⁺: район 30-й аминокислоты и область между 180 и 190 аминокислотами [9]. Ранее осуществлялись попытки изменения кофакторной специфичности НАДФ⁺-зависимых ферментов *B.subtillis* и *B.stearothermophilus* путем целенаправленной замены аминокислотных остатков в активном центре белка. Так, было показано, что единичные замены остатка аспартата в 32-м положении (D32E, D32A, D32N, D32G), остатков лейцина и пролина в положениях 187-188 (L187A, L187N - P188S), а также их комбинации в последовательности белка ГАФДГ *Bacillus* приводят к возникновению у фермента способности к использованию обоих кофакторов [8,10,11]. Тем не менее, полученные белки характеризовались пониженной ферментативной активностью.

В нашей работе мы предприняли попытку изменения кофакторной специфичности GapA *E.coli* направленным введением мутаций в НАД⁺-связывающие сайты фермента.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Бактериальные штаммы, плазмиды, реактивы.

В качестве богатой питательной среды использовали LB, минимальной среды - M9 [15]. Для получения твердых сред добавляли бактоагар ("Difco", США) в концентрации 1.5%. При выращивании бактерий на минимальной среде M9 добавляли D-глюкозу до концентрации 0.4%, этанол - 2%, глицерин - 0.4%, дрожжевой экстракт - 0.2%. При выращивании бактерий в минимальной жидкой среде M9 добавляли сахар до концентрации 0.2%, этанол - 1%, глицерин - 0.2%. Необходимые

факторы роста и антибиотики добавляли в следующие количества: тиамин - 5 мкг/мл, аминокислоты - 50 мкг/мл, ампициллин -100 мкг/мл, канамицин - 50 мкг/мл, хлорамфеникол – 40мкг/мл.

Таблица 1.

Бактериальные штаммы, использованные в данной работе.

| Штамм | Генотип | Источник |
|---|--|------------------|
| MG1655 | F ⁻ | CGSC 6300 |
| YA1461 | MG1655 P _{Lac} <i>adhE</i> *(E568K, I554S, E22G, M236V, A786V, Y461C) | [12] |
| YA1461 Δ <i>gapA</i> :: Km | P _{Lac} <i>adhE</i> *, Δ <i>gapA</i> :: <i>kan</i> | настоящая работа |
| MG1655 Cm- <i>ymlR</i> :: <i>gapA</i> | <i>ymlR</i> :: <i>gapA-cat</i> | настоящая работа |
| MG1655 Cm- <i>ymlR</i> :: <i>gapA</i> Δ | <i>ymlR</i> :: <i>gapA-cat</i> , Δ | настоящая работа |

Таблица 2.

Плазмиды, использованные в работе.

| Название | Устойчивость к антибиотикам | Характеристики | Источник |
|-----------------------|-----------------------------|--|-------------------|
| pKD46 | Amp | oriR101, repA101(ts), P _{araB} - <i>gam-bet-exo</i> | [13] |
| pKK233-2 | Amp | ori pBR322, P _{trc} <i>lacZ</i> , <i>rrnBT1T2</i> | Pharmacia, Швеция |
| pMW119-attLλ-Km-attRλ | Amp, Km | ori pSC101, attLλ- <i>kan</i> -attRλ | [14] |
| pMW119-attLλ-Cm-attRλ | Amp, Cm | ori pSC101, attLλ- <i>cat</i> -attRλ | [14] |

Amp – ампициллин, Cm- хлорамфеникол, Km – канамицин

Таблица 3.

Использованные в работе праймеры.

| Праймер | Последовательность |
|---------|--|
| P1 | 5'atgactatcaaaagtaggtatcaacgggtttggccgctatcgctcaagtagtataaaaaagct3' |
| P2 | 5'agatgtgagcgcaggtccagaactttgttgaggtgaagcctgctttttataactaag3' |
| P3 | 5'attccgcttgacgctgcg3' |
| P4 | 5'tcttaatcatgacgcagtc3' |
| P5 | 5'ttgagtctactcgggacccgctcgtttacgtgagtaatecgtcaagtagtataaaaaagctgaac3' |
| P6 | 5'gtgtaattgtttgttagaatcagtcactgaagcctgctttttataactaagttggc3' |
| P7 | 5'gccaacttagtataaaaaagcaggcttcagtgactgattctaacaacattaacac3' |
| P8 | 5'caccggagctccttgcatcgtcagttgctgtgtactgcaccaggcacagtgatctcaactatttgg3' |
| P9 | 5'catcatgacggcaatcccatcatg3' |
| P10 | 5'gctcttcagtatcaaatccgctg3' |
| P11 | 5'gttctgacatcgagatcgttgcaatcaacnntgttagacgctgattacatggcataca3' |
| P12 | 5'tgtatgcatgtaatcagcgtctaacagnnngtgattgcaacgatctcgatgcagaac3' |
| P13 | 5'cataagctttattggagatgtgagcgcaggt3' |
| P14 | 5'catggatcctgactgattctaacaacattaac3' |
| P15 | 5'gttgataccaatctcacaagactggcgcggc3' |
| P16 | 5'gtgagatttggtatcaacgggtttctgagtagcgg3' |
| P17 | 5'gttgatgttcgttctcacaagactggcgcggc-3' |
| P18 | 5'gtgagacggattatcaacgggtttctgagtagcgg3' |
| P19 | 5'cagaaaaccgttgatggccc3' |
| P20 | 5'cagaaaaccgttgataccaaa3' |
| P21 | 5'cagaaaaccgttgatgttcgt3' |

В работе использовались реактивы фирмы «Sigma», США.

Молекулярно-генетические и биохимические методы.

Трансформацию штаммов *E. coli*, получение лизатов фага P1vir и трансдукцию клеток проводили по методике Миллера [16].

Инактивация гена *gapA* на хромосоме *E. coli* осуществлялась с использованием Red системы фага λ по методу, описанному в работе [13] с использованием плазмид pKD46 и pMW119-attL-Km-attR [14]. Конструирование кассеты $\Delta gapA::Km$ осуществлялось с помощью праймеров P1-P2; проверка делеции гена *gapA* – с помощью праймеров P3-P4. Для конструирования кассеты, содержащей дополнительную копию гена *gapA*, были синтезированы два фрагмента: первый, несущий ген устойчивости к хлорамфениколу – на основе плазмиды pMW119-attL λ -Cm-attR λ с помощью праймеров P5 и P7; второй, несущий ген *gapA* с собственной регуляторной областью, – на основе хромосомы штамма MG1655 с помощью праймеров P6 и P8. Полученные фрагменты ДНК использовали в качестве матрицы для синтеза полноразмерной кассеты *cat-ymfR::gapA* посредством перекрывающейся ПЦР с использованием праймеров P5-P8. Введение дополнительной копии гена *gapA* в хромосому осуществлялось методом Red-зависимой интеграции; ее наличие контролировалось ПЦР с использованием праймеров P9-P10.

Выделение ДНК проводили с помощью наборов «Qiagen Miniprep kit» и «Qiagen DNA purification kit», согласно инструкциям производителя («Qiagen», США). Рестрикцию, лигирование фрагментов ДНК и электрофорез ДНК в агарозном геле осуществляли по стандартным методикам [15]. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили стандартным методом на амплификаторе GeneAmp PCR System 9700 («Applied Biosystems», США) [17]. Химический синтез олигонуклеотидов, используемых в качестве праймеров для проведения ПЦР, осуществлялся фирмой «Синтол», Россия. В работе были использованы ферменты фирмы «Fermentas», Литва.

Электрофорез тотального белка в 15%-полиакриламидном геле выполнен в соответствии с методикой, представленной Laemmli [18]. Определение количества белка в экстрактах проводилось по методу Брэдфорда с использованием реактива Bio-Rad Protein Assay («Bio-Rad Laboratories GmbH», Германия).

Для измерения активности ГАФДГ, культуру клеток выращивали в жидкой среде M9 или LB в течение 4 - 8 часов при 37°C (до OD₆₀₀ 2.0), центрифугировали, дважды промывали физиологическим раствором и разрушали с помощью звукового дезинтегратора в буфере следующего состава: 100 mM Tris-HCl, 20 mM KCl, 0.5 mM EDTA, 2 mM DTT, pH 7.5. Специфическая активность ГАФДГ в экстрактах измерялась по методу, описанному в [19], с добавлением в реакционную смесь НАД⁺ или НАДФ⁺ (2 mM) в качестве кофактора.

Конструирование плазмиды с геном *gapA*, кодирующем ГАФДГ с мутацией по 34-й аминокислоте.

Фрагмент (1.3 т.п.н.) гена *gapA*, несущий произвольную мутацию в триplete, соответствующую 34-й аминокислоте, был получен методом трёхстадийной ПЦР с использованием праймеров P11-P14 и геномной ДНК штамма *E. coli* MG1655 в качестве матрицы (Рис. 1).

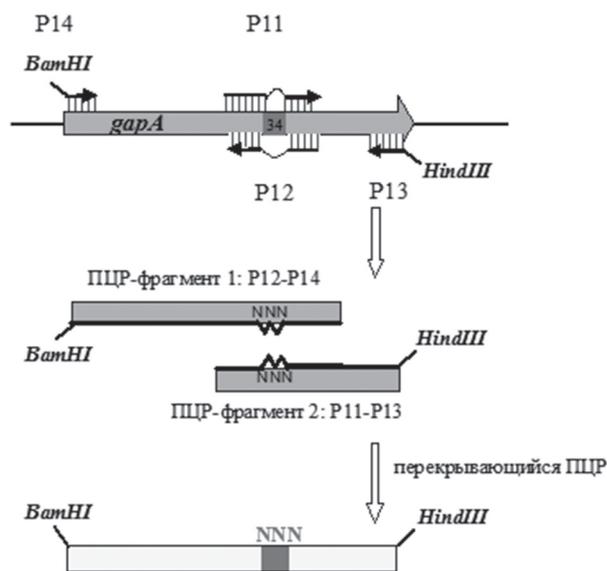


Рис. 1. Схема получения гена *gapA*, кодирующего ГАФДГ с мутацией по 34-й аминокислоте

На первом этапе получали фрагмент ДНК с использованием праймеров P12 и P14. Праймер P12 гомологичен участкам 130-102 п.н. и 99-71 п.н. *gapA*, между которыми включена произвольная последовательность pnp, соответствующая 102 -100 нуклеотидам гена. Праймер P14 гомологичен 5'-концу промотора P_{gapA} и содержит сайт рестриктазы *Bam*HI для дальнейшего клонирования в плазмиду. Далее получали ДНК-фрагмент с использованием праймеров P11 и P13. Праймер P11 гомологичен участкам 71-99 п.н. и 103-130 п.н. *gapA* с включенной между ними произволь-

ной последовательностью pnp, соответствующей положениям 100-102 гена. Праймер P13 гомологичен 3'-концу гена *gapA* и содержит сайт рестриктазы *HindIII* для дальнейшего клонирования.

Полученные фрагменты ДНК использовали в качестве матрицы для синтеза полноразмерного гена *gapA* при помощи перекрывающейся ПЦР с использованием праймеров P13 и P14. Целевой фрагмент обрабатывали рестриктазами *BamHI* и *HindIII* и клонировали в составе вектора рКК233-2/*BamHI-HindIII*. Таким образом, была получена библиотека плазмид рКК-*gapA*-34mut, содержащих мутантный ген *gapA*. Плазмиды трансформировали в штамм *E. coli* YA1461Δ*gapA*::Km с отбором трансформантов на полноценной среде с ампициллином.

Плазмида рКК-*gapA*^{wt} представляет собой вектор рКК233-2 с клонированным по сайтам *BamHI-HindIII* геном *gapA* дикого типа. Ген *gapA*^{wt} синтезирован методом ПЦР с использованием праймеров P3-P4 и геномной ДНК штамма *E. coli* MG1655 в качестве матрицы по стандартной методике [15].

Конструирование плазмид, с мутантным геном *gapA*, кодирующим белок с заменами Gly¹⁸⁸ и Pro¹⁸⁹

Мутации, приводящие к замене аминокислотных остатков Gly¹⁸⁸ и Pro¹⁸⁹ получали методом, описанным Liu H. and Naismith J.H. [20]. Для введения указанных мутаций в аминокислотную последовательность ГАФДГ были использованы пары праймеров, каждая из которых содержала перекрывающиеся последовательности на 3'-конце и праймер-праймер комплементарные (перекрывающиеся) последовательности на 5'-конце. Праймеры P15 и P16 использовали для замены Gly¹⁸⁸ на Thr (ggc на acc) и Pro¹⁸⁹ на Lys (csg на aaa), P17-P18 - для замены Gly¹⁸⁸ на Val (ggc на acg) и Pro¹⁸⁹ на Arg (csg на cgt). Мутантные плазмиды были проверены с помощью локус-специфического ПЦР, с использованием праймера P13 и соответствующих праймеров для каждой из введенных мутаций: P19 для определения исходных аминокислотных остатков Gly¹⁸⁸ и Pro¹⁸⁹; P20 для определения мутантных аминокислотных остатков Thr¹⁸⁸ и Lys¹⁸⁹; P21 для определения Val¹⁸⁸ и Arg¹⁸⁹.

Все мутантные плазмиды были трансформированы в штамм *E. coli* YA1461Δ*gapA*::Km с последующим отбором трансформантов на богатой среде с ампициллином.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Получение штамма *E. coli* с делецией гена *gapA*.

Ранее рядом авторов было показано, что клетки *E. coli*, несущие делецию гена *gapA*, не способны к росту ни на богатой, ни на минимальной среде с глюкозой в качестве источника углерода, но могут с низкой эффективностью утилизировать сукцинат и глицерин [21,22]. Мы попытались напрямую удалить *gapA* в хромосоме штамма MG1665, заменив его геном устойчивости к канамицину в результате интеграции кассеты Δ*gapA*::kan, однако нам не удалось отобрать ни одного жизнеспособного рекомбинантного клона. В связи с этим конструирование нужного штамма осуществлялось в два этапа. На первом в *ymfR*-локус MG1655 была введена вторая копия гена *gapA* с собственной регуляторной областью. Двукратное увеличение ферментативной активности ГАФДГ в рекомбинантных клонах подтвердило наличие функционального белка, кодируемого этим геном (Табл.4). После этого, для инактивации природной копии *gapA* с помощью системы Red-зависимой рекомбинации в полученный штамм MG1655cat-*ymfR*::*gapA* была интегрирована кассета Δ*gapA*::kan и отобраны канамицин-устойчивые клоны. Активность ГАФДГ в клеточных экстрактах подтвердила делецию природной копии гена в хромосоме (Табл.4).

Таблица 4.
Активность ГАФДГ в различных штаммах *E. coli*.

| Штамм | Специфическая активность ГАФДГ, мкмоль*мин ⁻¹ *мг ⁻¹ |
|---|--|
| MG1655 | 0.49 ± 0.03 |
| MG1655 Cm- <i>ymfR</i> :: <i>gapA</i> | 0.88 ± 0.04 |
| MG1655Cm- <i>ymfR</i> :: <i>gapA</i> Δ <i>gapA</i> :: Km | 0.41 ± 0.02 |
| YA1461Δ <i>gapA</i> :: Km | <0.005 |

Для дальнейшей работы в качестве реципиентного был выбран штамм YA1461, содержащий устойчивую к кислороду мутантную алкогольдегидрогеназу (AdhE). Этот фермент, катализируя превращения этанола в ацетил-коэнзим А, обеспечивает поступление последнего непосредственно в цикл трикарбоновых кислот, что должно существенно улучшать рост клеток, дефектных по ГАФДГ. Локус с делецией Δ*gapA*::Km был перенесен в хромосому реципиентного штамма с помощью P1-трансдукции. Селекцию клонов YA1461Δ*gapA*::Km проводили на минимальной среде с этанолом, глюкозой и канамицином. Отсутствие в них активности ГАФДГ подтвердило инактивацию гена *gapA* в хромосоме (Табл.4).

Для полученного штамма были подобраны оптимальные условия культивирования. Наиболее быстрый рост клеток наблюдался на среде с добавлением глюкозы (0.2%), этанола (1%) и дрожжевого экстракта (0.2%), и все последующие манипуляции проводили на этой среде.

Конструирование ГАФДГ *E.coli* с измененной кофакторной специфичностью.

Как упоминалось ранее, аминокислотная последовательность гликолитических ГАФДГ про- и эукариот характеризуется высокой степенью консервативности. Так, рядом авторов было показано, что для природных белков разных видов *Bacillus* наличие остатка Asp в положении 32 и Leu-Pro в положениях 187-188 напрямую связано с НАД⁺-специфичностью фермента и исключает связывание НАДФ⁺ [8,10]. В то же время присутствие Ala или Gly в положении 32 и Ala-Ser в 187-188 локусе приводит к возникновению сродства к НАДФ⁺. Согласно авторам приведенных работ, изменения аминокислотной последовательности белка, направленные на преодоление стерических затруднений при связывании субстрата или влияющие на характер электростатического взаимодействия между аминокислотными остатками в активных центрах, могут привести к изменению кофакторной специфичности фермента. На первом этапе мы попытались получить НАДФ⁺-зависимую ГАФДГ *E.coli*, кодируемую геном *gapA*, заменив остаток аспартата в 34 положении белковой цепи (это положение соответствует 32-му аминокислотному остатку *B.subtilis*).

Ген *gapA* дикого типа с собственной регуляторной областью был клонирован в составе вектора рКК233-2. После этого на основе рекомбинантной плазмиды рКК233-*gapA*^{wt} с помощью сайт-направленного мутагенеза был синтезирован набор мутантов со случайной заменой кодона *gac*, кодирующего остаток аспарагиновой кислоты в 34-ом положении *GapA*. Полученные плазмиды были введены в штамм *E. coli* YA1461Δ*gapA*::Km с последующим отбором трансформантов на богатой среде с ампициллином. Рост культуры на этой среде однозначно свидетельствовал о присутствии в клетке активной ГАФДГ. В отобранных клонах была измерена активность ГАФДГ в присутствии НАД⁺ и НАДФ⁺ в качестве кофакторов. Среди проверенных вариантов было найдено четыре с экспрессией фермента с двойной кофакторной специфичностью. Анализ нуклеотидной последовательности гена *gapA* в этих плаزمидях выявил единичные мутации, приводящие к заме-

не D34A (*gac* на *gct*), D34K (*gac* на *aaa*), D34P (*gac* на *ccc*) и D34L (*gac* на *ctc*) в 34-м положении аминокислотной последовательности ГАФДГ. При этом, если замена остатка аспартата на аланин, обеспечивающая наибольший уровень активности, ранее была описана в работах ряда авторов как необходимая для связывания НАДФ⁺, то о влиянии трех других мутаций на связывание кофактора известно не было. Заметим, что во всех четырех случаях появление сродства к НАДФ⁺ сопровождалось значительным падением суммарной активности ГАФДГ по сравнению с активностью фермента дикого типа (Табл.5). Как видно из Рис.2, количество нативного и мутантных белков в клетке примерно одинаково для всех вариантов, значит, замена Asp в 34-ом положении действительно приводит к падению скорости ферментативной реакции, и низкая активность ГАФДГ есть характеристика самого фермента.

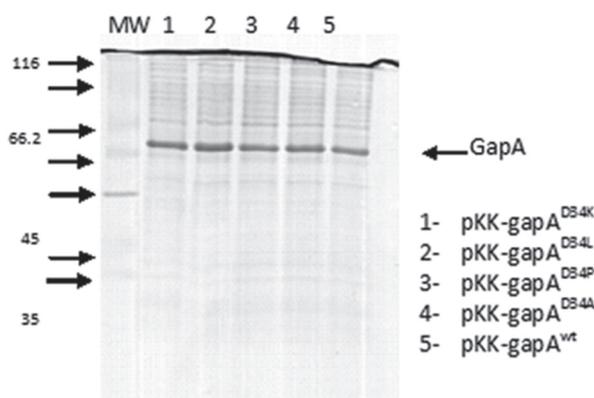


Рис. 2. ДСН-ПААГ анализ общего белка клонов *E. coli* YA1461Δ*gapA*::Km, несущих плазмиды с мутантным геном *gapA*.

Таблица 5. НАД⁺/НАДФ⁺-зависимая активность ГАФДГ в плазмидных штаммах *E. coli* YA1461Δ*gapA*::Km, несущих ген *gapA* с мутацией в 34-м триплете.

| Плаزمида | Специфическая активность ГАФДГ, мкмоль*мин ⁻¹ *мг ⁻¹ | |
|----------------------------------|--|-------------------|
| | НАД ⁺ | НАДФ ⁺ |
| pKK- <i>gapA</i> ^{D34K} | 0.04±0.002 | 0.034±0.003 |
| pKK- <i>gapA</i> ^{D34L} | 0.037±0.004 | 0.022±0.003 |
| pKK- <i>gapA</i> ^{D34P} | 0.23±0.015 | 0.061±0.004 |
| pKK- <i>gapA</i> ^{D34A} | 1.95±0.07 | 0.69±0.015 |
| pKK- <i>gapA</i> ^{wt} | 18.85±0.15 | <0.01 |

На следующем этапе нашей работы мы попытались получить НАДФ⁺-зависимую ГАФДГ *E.coli*, модифицируя второй значимый для связывания кофактора локус. Выравнивание аминокис-

лотных последовательностей различных ГАФДГ указывает на то, что этому локусу у *E. coli* соответствуют 188-189 аминокислотные остатки. Решено было заменить природные глицин и пролин в этих положениях в соответствии с анализом последовательностей активных центров НАДФ⁺-зависимых белков (Рис. 3).

GapA (НАД⁺-зависимая)

| | |
|--|----------------|
| <i>E. coli</i> (<i>gapA</i>) | НАТТАТQKTVDGPS |
| <i>B. subtilis</i> (<i>gapA</i>) | HSYTNDQQILDLPH |
| <i>H. pylori</i> (<i>gap1</i>) | HSYTSQKLLIDLAH |
| <i>N. gonorrhoeae</i> (<i>gap1</i>) | НАYТGDQNTLDAPH |
| <i>N. meningitidis</i> (<i>gap1</i>) | НАYТGDQNTLDAPH |

GapB (НАДФ⁺-зависимая)

| | |
|--|----------------|
| <i>H. pylori</i> (<i>gap2</i>) | HSYTNDQNLDITKH |
| <i>N. gonorrhoeae</i> (<i>gap2</i>) | НАLTNDQTVTDVRH |
| <i>N. meningitidis</i> (<i>gap2</i>) | НАLTNDQTVTDVRH |

Рис. 3. Выравнивание аминокислотных последовательностей активных центров ГАФДГ различных микроорганизмов.

На основе рКК233-*gapA*^{wt} были получены два варианта мутантных ГАФДГ с заменой в положениях 188-189: Gly¹⁸⁸Pro¹⁸⁹ → Thr¹⁸⁸Lys¹⁸⁹ (по гомологии с НАДФ⁺-зависимой *Gap2 H. pylori*), Gly¹⁸⁸Pro¹⁸⁹ → Val¹⁸⁸Arg¹⁸⁹ (по гомологии с НАДФ⁺-зависимой *Gap2 N. meningitidis* и *N. gonorrhoeae*). Анализ нуклеотидных последовательностей гена *gapA* подтвердил наличие мутаций в обоих случаях. Все мутантные плазмиды были введены в штамм с делецией собственного гена *gapA*, после чего в клетках была измерена специфическая активность ГАФДГ.

Как видно из Табл.6, в обоих случаях мутантные ГАФДГ обнаружили заметный уровень активности ГАФДГ в присутствии НАДФ⁺. При этом, НАДФ⁺-зависимая удельная активность *GapA*^{G188V-P189R} была сравнима с активностью белка дикого типа, а *GapA*^{G188T-P189K} даже превосходила последнюю. Как отмечалось выше, в клетках *Bacillus* наиболее важным для связывания кофактора ГАФДГ является 32-й аминокислотный остаток, а замены в положении 187-188 лишь незначительно улучшают связывание с НАДФ⁺. В то же время согласно нашей работе в клетках *E. coli* замены в 188-189 положениях ГАФДГ могут приводить не только к появлению средства к НАДФ⁺, но, в некоторых случаях, и к заметному увеличению НАДФ⁺-зависимой активности фермента по сравнению с природным белком. Эти данные

позволяют говорить о крайне важной роли локуса 188-189 как в обеспечении уровня удельной активности *GapA E. coli*, так и его кофакторной специфичности.

Согласно данным литературы о пространственной структуре ГАФДГ, оба локуса (34-й и 188-й) находятся в непосредственной близости друг от друга и принимают участие в формировании активного центра белка [8,10,11], поэтому было решено объединить мутации в обоих значимых участках. Мы синтезировали набор генов с заменами в этих локусах, клонировали их в составе вектора рКК233-2, после чего была измерена ферментативная активность соответствующих мутантных белков. Лучшие из исследованных вариантов с измененной кофакторной специфичностью приведены в Табл.6.

Можно видеть, что совмещение замен в положениях 34 и 188-189 изменило не только удельную активность ГАФДГ, но и соотношение НАДФ⁺/НАДФ⁺-зависимых активностей. Так, объединение мутаций 34К и 188V-189R существенно улучшило связывание НАДФ⁺ мутантным ферментом (по сравнению с исходными вариантами с мутацией в одном локусе), при полном сохранении высокого уровня НАДФ⁺-зависимой активности, характерном для *GapA*^{G188V-P189R}. Определенный интерес представляет белок *GapA*^{D34AG188T P189K}, у которого снижен уровень суммарной активности, но соотношение НАДФ⁺/НАДФ⁺-специфических активностей почти одинаково. На Рис.4 схематически изображено взаимодействие белок/кофактор для нативной и мутантной ГАФДГ.

Таким образом, на базе НАДФ⁺-зависимого ГАФДГ *E. coli* нам впервые удалось получить на-

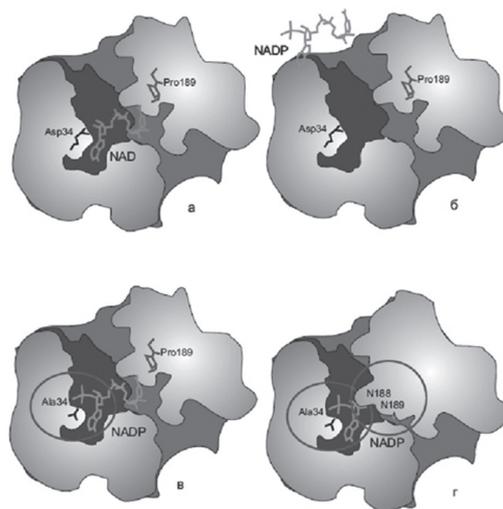


Рис. 4. Схема взаимодействия нативной и модифицированной ГАФДГ с кофакторами.

бор мутантов с двойной кофакторной специфичностью, характеризующихся различной степенью сродства к кофакторам, а также различным уровнем удельной активности.

Таблица 6.

НАД⁺/НАДФ⁺-зависимая активность АФДГ штамма YAI461ΔgapA::Kt, несущего плазмиды с мутантными gapA

| Плаزمида | Специфическая активность АФДГ, мкмоль*мин ⁻¹ *мг ⁻¹ | |
|--------------------------------------|---|-------------------|
| | НАД ⁺ | НАДФ ⁺ |
| нет | 0.83±0.05 | <0.005 |
| pKK-gapA ^{wt} | 19.88±0.12 | <0.01 |
| pKK-gapA ^{G188T P189K} | 33.38±0.24 | 5.27±0.11 |
| pKK-gapA ^{G188V P189R} | 19.90±0.11 | 0.21±0.08 |
| pKK-gapA ^{D34A} | 2.02±0.08 | 0.91±0.07 |
| pKK-gapA ^{D34A G188T P189K} | 2.09±0.11 | 2.18±0.09 |
| pKK-gapA ^{D34A G188V P189R} | 0.099±0.004 | 0.091±0.006 |
| pKK-gapA ^{D34K} | 0.040±0.005 | 0.035±0.004 |
| pKK-gapA ^{D34K G188T P189K} | 0.139±0.006 | 0.104±0.005 |
| pKK-gapA ^{D34K G188V P189R} | 21.60±0.10 | 3.76±0.06 |

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проделанной работы нами впервые была продемонстрирована возможность изменения кофакторной специфичности глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы *E.coli* и получен набор ферментов с двойной кофакторной специфичностью, характеризующихся различной степенью сродства к НАД⁺/НАДФ⁺. Наши данные свидетельствуют о том, что в белке дикого типа два локуса – остатки Asp³⁴ и Gly¹⁸⁸-Pro¹⁸⁹ - действительно определяют тотальную активность белка и отвечают за его связывание с НАД⁺, а замена этих аминокислотных остатков в ряде случаев приводит к тому, что фермент становится способным использовать НАДФ⁺ в качестве кофактора. При этом, результатом замен в положении 188-189 ГАФДГ могут быть не только появление сродства к НАДФ⁺, но и заметное увеличение НАД⁺-зависимой активности фермента по сравнению с природным белком, что позволяет говорить о крайне важной роли именно этого локуса в обеспечении уровня удельной активности и кофакторной специфичности GapA *E.coli*.

Авторы благодарны Птицыну Л.Р. (ЗАО «АГРИ», Москва) за консультации при написании данной работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gunnarsson N. Control of fluxes towards antibiotics and the role of primary metabolism in production of antibiotics / N. Gunnarsson, A. Eliasson,

J. Nielsen // Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. — 2004. — Vol. 88 — P.137-178.

2. The soluble and membrane-bound transhydrogenases UdhA and PntAB have divergent functions in NADPH metabolism of *Escherichia coli* / U. Sauer [et al.] // J. Biol. Chem. — 2004. — Vol. 279, №8 — P. 6613-9.

3. Mascarenhas D. Deletion of *pgi* alters tryptophan biosynthesis in a genetically engineered strain of *Escherichia coli* / D. Mascarenhas, D. Ashworth, C. Chen // Appl. Environ. Microbiol. — 1991. — Vol. 57, №10 — P. 2995-2999.

4. Conformational changes associated with cofactor/substrate binding of 6-phosphogluconate dehydrogenase from *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: Implications for enzyme mechanism / Y. Chen [et al.] // J. Struct. Biol. — 2010. — Vol.169, №1 — P. 25-35.

5. Valverde F. Engineering a central metabolic pathway: glycolysis with no net phosphorylation in an *Escherichia coli* gap mutant complemented with a plant GapN gene / F. Valverde, M. Losada, A. Serrano // FEBS Lett. — 1999. — Vol. 449, №2-3 — P. 153-158.

6. Fothergill-Gilmore L.A. Evolution of glycolysis / L.A. Fothergill-Gilmore, P.A.M. Michels // Biophys. Mol. Biol. — 1993. — Vol. 59. — P. 105-235.

7. Identification of the first fungal NADP-GAPDH from *Kluyveromyces lactis* / R. Verho [et al.] // Biochemistry. — 2002. — Vol.41, №46 — P. 13833-13838.

8. Two glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases with opposite physiological roles in a nonphotosynthetic bacterium / S. Fillinger [et al.] // J. Biol. Chem. — 2000. — Vol. 275, №19 — P. 14031-14037.

9. Probing the coenzyme specificity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases by site-directed mutagenesis / C. Corbier [et al.] // Biochemistry. — 1990. — Vol. 29. — P. 7101-7106.

10. Determinants of coenzyme specificity in glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: role of the acidic residue in the fingerprint region of the nucleotide binding fold / S. Clermont [et al.] // Biochemistry. — 1993. — Vol. 32, №38 — P. 10178-10184.

11. A crystallographic comparison between mutated glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases from *Bacillus stearothermophilus* complexed with either NAD⁺ or NADP⁺ / C. Didierjean [et al.] // J. Mol. Biol. — 1997. — Vol. 268, № 4 — P. 739-759.

12. A method for producing an L-amino acid using a bacterium of the Enterobacteriaceae family /

Ptitsyn L. R. [et al.] // EP 2046949 B1 (15.01.2014). — Bulletin 2014/03, — P. 95.

13. Datsenko K.A. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products / K.A. Datsenko, B.L. Wanner // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 2000 — Vol.97. — P. 6640-6645.

14. Каташкина Ж.И. Разработка и использование методов направленной модификации целевых генетических локусов хромосомы *E.coli* при конструировании штаммов-продуцентов аминокислот / Ж.И.Каташкина // Дисс. на соиск. уч. ст. канд. биол. наук, Москва: 2003. — 120 с.

15. Sambrook, J. Molecular cloning: a laboratory manual / J.Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis. - Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

16. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике / Дж. Миллер. — Москва: Мир, 1976. — 436с.

17. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocols / C. Beverly [et al.] // Methods in Molecular Biology. — 1993. — Vol. 15. — P. 1-29.

18. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / UK. Laemmli // Nature. — 1970. — Vol. 227, №5259 — P. 680-685.

19. Lamed R. Glucose fermentation pathway of *Thermoanaerobium brockii* / R. Lamed, JG. Zeikus // J. Bacteriol. — 1980. — Vol. 141, № 3 — P. 1251-1257.

20. Liu H. An efficient one-step site-directed deletion, insertion, single and multiple-site plasmid mutagenesis protocol / H.Liu, J.H. Naismith // BMC Biotech. — 2008. — P. 8-91.

21. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection / T. Baba [et al.] // Mol. Syst. Biol. — 2006. — Epub; 2: 0008.

22. Characterization of *Escherichia coli* strains with *gapA* and *gapB* genes deleted / F.D.Seta [et al.] // J. Bacteriology. — 1997. — Vol.179. — P. 5218 – 5221.

Научно-исследовательский институт
Аджиномото-Генетика

Сливинская Е. А., научный сотрудник
E-mail: katya_slivinskaya@agri.ru

Альтман И. Б., старший научный
сотрудник

E-mail: irina_altman@agri.ru

Ямпольская Т. А., старший научный
сотрудник

E-mail: tatiana_yampolskaya@agri.ru

Ajinomoto - Genetika Research Institute

Slivinskaya E. A., scientific researcher
E-mail: katya_slivinskaya@agri.ru

Altman I. B., senior researcher
E-mail: irina_altman@agri.ru

Yampolskaya T. A., senior researcher
E-mail: tatiana_yampolskaya@agri.ru