

УДК 577.12

ВЛИЯНИЕ N^ε-АЦЕТИЛИРОВАНИЯ НА ЭНЗИМАТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ГЛИЦЕРАЛЬДЕГИД-3-ФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ *Escherichia coli*

© 2023 г. Н. С. Плеханова¹, *, И. Б. Альтман², М. С. Юркова¹, А. Н. Федоров¹

¹ Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии”
Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

² МИРЭА – Российский технологический университет, Москва, 119454 Россия

*e-mail: plekhanovans@mail.ru

Поступила в редакцию 20.06.2023 г.

После доработки 29.06.2023 г.

Принята к публикации 06.07.2023 г.

Ацетилирование лизина является глобальным регуляторным механизмом, который влияет на большинство клеточных процессов. В данной работе мы изучили влияние ацетилирования и деацетилирования на активность белков глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ГАФД) *E. coli* дикого типа и мутантных форм. Наши результаты показали, что обработка ГАФД дикого типа ацетилтрансферазой PatZ *in vitro* приводила к двукратному увеличению ферментативной активности, в то время как последующее деацетилирование снижало активность фермента до уровня, близкого к исходному. В случае мутантных форм фермента было показано, что появление дополнительных сайтов ацетилирования существенно изменяло влияние процессов ацетилирования/деацетилирования на активность ГАФД. Эти данные позволяют по-новому взглянуть на роль ацетилирования в регуляции активности ГАФД *E. coli*.

Ключевые слова: глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, ацетилирование, ацетилтрансфераза, деацетилаза, регуляция активности ГАФД

DOI: 10.31857/S0555109923060119, EDN: CWOIDD

Ацетилирование лизина является глобальным регуляторным механизмом, который влияет на большинство клеточных процессов. Важной особенностью такого механизма регуляции является его влияние на распределение углеродных потоков между путями метаболизма, такими, как гликолиз и глюконеогенез, между циклом трикарбоновых кислот и глиоксилатным шунтом, а также между гликолизом и циклом трикарбоновых кислот. Регулирование подобного рода можно добиться путем ацетилирования ключевых ферментов центрального метаболизма [1–3]. Одним из объектов для такого рода модификаций является глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (ГАФД). Данный фермент играет важную роль в пути Эмбдена-Мейерхоффа-Парнаса и глюконеогенезе. ГАФД катализирует окисление D-глицеральдегид-3-фосфата до 1,3-бисфосфоглицерата с восстановлением НАД⁺ до НАДН.

Ранее была продемонстрирована возможность изменения кофакторной специфичности глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы *Escherichia coli* и получен набор ферментов с двойной кофакторной специфичностью, характеризующихся различной

степенью сродства к НАД⁺/НАДФ⁺. Описанные аминокислотные замены D34K и P189K способны вносить дополнительные сайты ацетилирования фермента, что, в свою очередь, может влиять на энзиматическую активность ГАФД [4].

Из литературных данных известно о наличии сайтов ацетилирования ГАФД у штаммов дикого типа, однако механизм, по которому происходит их ацетилирование, не был исследован [5].

Цель работы — исследование влияния ацетилирования на энзиматическую активность ГАФД, а также влияние на этот процесс единственной охарактеризованной ацетилтрансферазы *E. coli* PatZ и неспецифичной к механизму ацетилирования деацетилазы CobV [6].

МЕТОДИКА

Бактериальные штаммы, плазмиды и ростовые среды. В качестве полноценной питательной среды использовали LB “ДиаМ” (Россия), минимальной — M9 (“Sigma-Aldrich”, США) [7]. Для получения твердых сред в жидкие добавляли бактоагар (“Difco”, США) в концентрации 1.5%. Все

Таблица 1. Бактериальные штаммы, использованные в работе

Штамм	Генотип	Источник
MG1655	F ⁻	CGSC 6300
BL21(DE3)	F ⁻ ompT hsdSB (rB ⁻ , mB ⁻) gal dcm (DE3)	Лабораторная коллекция

Таблица 2. Плазмиды, использованные в работе

Плазмида	Устойчивость к антибиотикам	Характеристики	Ссылка
pKD20	Amp	oriR101, rePA101(ts), P- <i>gam-bet-exo</i>	[9]
pKK- <i>gapA</i> ^{WT}	Amp	ori pBR322, PlacZ, rrnBT1T2	[4]
pKK- <i>gapA</i> ^{D34K}	Amp	ori pBR322, PlacZ, rrnBT1T2	[4]
pKK- <i>gapA</i> ^{D34AG188TP189K}	Amp	ori pBR322, PlacZ, rrnBT1T2	[4]

использованные в работе штаммы и плазмиды приведены в табл. 1 и 2.

Трансформация, трансдукция и получение генетических модификаций в хромосоме *E. coli*. Трансформацию штаммов *E. coli*, получение трансдуцирующих фагов P1vir и трансдукцию проводили согласно общепринятым экспериментальным протоколам [8, 9]. Инактивацию генов в хромосоме *E. coli* осуществляли с использованием Red-системы фага λ по методу, описанному в работе [9], с помощью хелперной плазмиды pKD20 и хромосомальной ДНК (λattL-KmR-λattR) в качестве донора “вырезаемого” маркера антибиотикоустойчивости [9].

Методы работы с ДНК. Выделение ДНК проводили с помощью наборов Plasmid Miniprep и Cleanup Standard, согласно инструкциям производителя (“Евроген”, Россия). Электрофорез ДНК в агарозном геле осуществляли по стандартным методикам. Стандартный метод ПЦР воспроизводили с помощью амплификатора GeneAmp PCR System 9700 (“Biorad”, США). Химический синтез олигонуклеотидных праймеров для ПЦР осуществляла фирма “Синтол” (Россия). Нуклеотидный состав праймеров приведен в табл. 3.

Для конструирования кассеты, содержащей дополнительную копию гена *gapA*, были синтезированы два фрагмента: первый, несущий ген устойчивости к канамицину - на основе фрагмента attLλ-Km-attRλ с помощью праймеров P1 и P2; второй, несущий ген *gapA** с собственной регуляторной областью, - на основе плазмид pKK-*gapA*^{WT}, pKK-*gapA*^{D34K} или pKK-*gapA*^{D34KG188TP189K} с помощью праймеров P3 и P4. Полученные фрагменты ДНК использовали в качестве матрицы для синтеза полноразмерной кассеты *km-ybhB::gapA* посредством перекрывающейся ПЦР с использова-

нием праймеров P1 и P4. Введение дополнительной копии гена *gapA* в хромосому осуществлялось методом Red-зависимой интеграции; ее наличие контролировалось ПЦР с использованием праймеров P5-P6. В заключение маркер устойчивости к канамицину был удален, что также контролировалось ПЦР с использованием праймеров P5-P6.

Инактивация гена *gapA* на хромосоме *E. coli* осуществлялась с использованием Red системы фага λ по методу, описанному в работе [9] с использованием плазмиды pKD20. Конструирование кассеты Δ*gapA::Km* осуществлялось с помощью праймеров P9-P10; проверка делеции гена *gapA* - с помощью праймеров P7-P8.

Измерение энзиматических активностей. Для измерения активности ГАФД культуру клеток выращивали в жидкой среде M9 в течение 4–8 ч при 37°C (до OD₆₀₀ 2.0), центрифугировали, дважды промывали физиологическим раствором и разрушали с помощью звукового дезинтегратора в буфере следующего состава: 100 мМ Tris-HCl, 20 мМ KCl, 0.5 мМ EDTA, 2 мМ DTT, pH 7.5.

Активность ГАФД измеряли спектрофотометрически в клеточных экстрактах по методике, описанной ранее [10], с добавлением в качестве кофактора НАД⁺ или НАДФ⁺ (2 мМ). Очистку ГАФД для определения кинетических параметров проводили фракционным осаждением (NH₄)₂SO₄, как описано ранее [4]. Для дальнейшей работы использовали фракцию белка, осажденную при 75–85% (III) насыщения сульфатом аммония.

Электрофорез тотального белка в 15%-полиакриламидном геле выполнен в соответствии с методикой, представленной Лэмли [11]. Определение количества белка в экстрактах проводилось по методу Брэдфорда с использованием реактива Bio-Rad Protein Assay (“Bio-Rad Laboratories GmbH”, Германия).

Таблица 3. Праймеры, используемые для делеции генов и проверки полученных мутаций

ID	Праймер	Последовательность (5'→3')
Праймеры, используемые для интеграции мутантных генов <i>gapA</i> в хромосому		
P1	<i>ybhB</i> -Km	ctttctgcaacaagaaggagggttcagcgctcaagttagtagataaaaaagctgaacgag
P2	<i>gapA</i> -Km	gccagttgggtgtaattgtttgttagaatcgtaattgaacgctgcttttta
P3	Km- <i>gapA</i>	acttagtagataaaaaagcaggcttcaattacgattctaacaaaacattaac
P4	<i>gapA</i> - <i>ybhB</i>	gcccattctggcagagtgattaaactaacatcgagtaattatttggagatgtgagcgatcaggt
P5	<i>ybhB</i> -up	gcaacagttgcagcgctctga
P6	<i>ybhB</i> -down	gttgagctacaggcggtcag
Праймеры, используемые для делеции нативного гена <i>gapA</i>		
P7	<i>gapA</i> -down	tgatttcagcgctccacggcag
P8	<i>gapA</i> -up	gccgtcacgctgtttatgc
P9	del- <i>gapA</i> -R	gctcacatctcactttaatcgctcacattacgtgactcgctcaagttagtagataaaaaagc
P10	del- <i>gapA</i> -L	gatgtgatttcagcgctccacggcaggttgcgggcaaatgaagcctgctttttataactaag
Праймеры, используемые для клонирования гена <i>patZ</i>		
P11	<i>patZ</i> -HindIII-NotI	ttgccagcgcgaggaaatcaagcttgcggccgactcgag
P12	<i>patZ</i> -NcoI	ccagtcctcgctgacccatggccatcgcc
Праймеры, используемые для клонирования гена <i>cobB</i>		
P13	<i>cobB</i> -NcoI	gatgaccccgacgacacccatggccatcgccggctg
P14	<i>cobB</i> -HindIII-NotI	gattaaaagcgggaagcattgccaagcttgcggccgactcgagcac

Клонирование гена *patZ* и *cobB*. На первом этапе получали фрагмент ДНК, соответствующий гену *patZ*, с использованием праймеров P11 и P12. Праймер P11 гомологичен 3'-концу гена и содержит сайт узнавания рестриктазы *Bam*HI. Праймер P12 гомологичен 5'-концу гена и содержит сайт узнавания рестриктазы *Nco*I для дальнейшего клонирования в плазмиду. Аналогичным образом был получен фрагмент, соответствующий гену *cobB*, с помощью праймеров P13 и P14. Целевые фрагменты обрабатывали рестриктазами *Bam*HI и *Nco*I и клонировали в составе вектора pET22/*Bam*HI-*Nco*I, последовательность генов подтверждали секвенированием. Штамм *E. coli* BL21 (DE3) был трансформирован полученными плазмидами с последующим отбором трансформантов на среде LB с ампициллином.

Очистка ферментов CobB и PatZ. Клетки штаммов *E. coli* BL21(DE3)[pET22-cobB] и BL21(DE3)[pET22-patZ], содержащие ген РНК-полимеразы фага T7 под контролем промотора *P_{lacUV5}* в хромосоме, а гены исследуемых ферментов под контролем промотора, узнаваемого РНК-полимеразой T7, в составе рекомбинантных плазмид, выращивали в колбах (200 мл) в среде LB с добавлением Ар до ОП₆₀₀ = 1. Синтез целевых белков индуцировали добавлением 1мМ изопропил-β-D-1-тиога-лактопиранозид (ИПТГ) и продолжали культиви-

рование в течение 3 ч. Для очистки ферментов выращенные клетки BL21(DE3)[pET22-cobB] и BL21(DE3)[pET22-patZ] осаждали центрифугированием, промывали 10 мл физиологического раствора NaCl, ресуспендировали в буфере А (20 мМ фосфат натрия pH 7.0; 1 мМ ДТТ; 1 мМ ЭДТА) и разрушали с помощью ультразвукового дезинтегратора. Клеточные обломки и остатки неразрушенных клеток удаляли центрифугированием. Из полученного супернатанта выделяли целевые белки с помощью металл-хелатной хроматографии на колонке HisTrap HP согласно рекомендациям производителя ("GE Healthcare", Великобритания).

Ацетилирование ε-аминогрупп остатков лизина в целевых белках *in vitro*. Реакцию ацетилирования *in vitro* проводили, как описано ранее [12]. В качестве субстрата использовали III белковую фракцию ГАФД и 50 нг очищенного фермента PatZ. Реакционные смеси инкубировали при 37°C в течение различных промежутков времени и анализировали ферментативную активность ГАФД.

Деацетилирование ε-аминогрупп остатков лизина в целевых белках *in vitro*. Реакцию *in vitro* проводили, как описано [12]. В качестве субстрата использовали III белковую фракцию ГАФД в отсутствие или в присутствии 50 нг очищенного фермента CobB и 2 мМ НАД⁺. Реакционные сме-

си инкубировали при 37°C в течение 1 ч и затем измеряли ферментативную активность ГАФД.

Реализацию процессов ацетилирования/деацетилирования целевого белка контролировали электрофорезом в полиакриламидном геле в нативных условиях [13].

Построение 3Д-структур белков с аминокислотными заменами. В качестве основы для моделирования была взята трехмерная структура ГАФД 1S7C. Сервером I-TASSER [14] были предсказаны мономерные субъединицы белков с аминокислотными заменами. Выравнивание, уточнение и визуализация трехмерных структур осуществлялись с помощью PyMOL v.2.5.0.

Для описания введенных посттрансляционных модификаций было выбрано силовое поле Charmm 36M дополнительной параметризацией [15].

Докинг. Расчеты стыковки проводились с использованием DockingServer [16]. Силовое поле MMFF94 [17] использовали для минимизации энергии молекулы лиганда (DL-глицеральдегид-3-фосфат) с помощью DockingServer. Исходное положение, ориентация и кручение молекул лиганда задавались случайным образом. Каждый эксперимент по стыковке был получен из 100 различных запусков, которые должны были завершиться после максимум 250 000 оценок энергии. Размер популяции был установлен равным 150. Во время поиска применялись поступательный шаг 0.2 Å, кватернионный и торсионный шаги 5.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Ацетилирование аминокислотного остатка лизина — универсальный регуляторный механизм, оказывающий влияние на все клеточные процессы. Идентификация широкого ряда ацетилированных метаболических ферментов как у человека, растений [18], так и у прокариот [19], а также анализ литературных данных о различных метаболических регуляторных ролях этой модификации [20] указывает на то, что обратимое ацетилирование аминокислотного остатка лизина может представлять собой эволюционно консервативный механизм метаболической регуляции как у эукариот, так и у прокариот [21].

Согласно опубликованным литературным данным, ацетилирование аминокислотных остатков лизина ГАФД по-разному влияет на ее активность у эукариот в зависимости от типа и состояния клеток. Например, в эмбриональных клетках почек человека (HEK293T) ацетилирование ГАФД по остатку лизина 254 повышает ее ферментативную активность в ответ на глюкозу [22]. В клетках фибробластов мыши (NIH3T3) ацетилирование ГАФД усиливает ее транслокацию из цитоплазмы в ядро, тем самым ингибируя нисходя-

щий гликолиз и накопление промежуточных продуктов гликолиза [23]. В растениях ацетилирование ГАФД снижает ее ферментативную активность, а также ее взаимодействие с другими гликолитическими ферментами [24]. Следовательно, ацетилирование аминокислотных остатков лизина ГАФД может модулировать ее функцию и по-разному влиять на гликолиз в различных организмах в разных условиях. Однако влияние ацетилирования лизиновых остатков ГАФД у *E. coli* до сих пор детально не изучено.

Ранее 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⁺. Описанные аминокислотные замены D34K и P189K способны вносить дополнительные сайты ацетилирования фермента, что, в свою очередь, может влиять на энзиматическую активность ГАФД [4].

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 [25]. Исходя из этого, конструирование целевого штамма осуществлялось в два этапа. На первом этапе в *ybhB*-локус MG1655 были введены гены *gapA*^{WT}, *gapA*^{D34K} и *gapA*^{D34AG188TP189K} с собственной регуляторной областью в качестве второй копии. Выбранный ген *ybhB* не является значимым для *E. coli*, то есть с делецией этого гена штаммы способны расти как на богатой среде LB, так и на минимальной — M9. И, как видно на рисунке 1, удаление данного гена не приводило к изменениям в ростовых характеристиках штамма. Описанные ранее плазмиды были использованы в качестве матрицы для амплификации мутантных генов. После этого для инактивации природной копии *gapA* в полученные штаммы MG1655 *ΔybhB::gapA*^{WT}, MG1655 *ΔybhB::gapA*^{D34K} и MG1655 *ΔybhB::gapA*^{D34AG188TP189K} была интегрирована кассета *ΔgapA*^{native::kan} с помощью системы Red-зависимой рекомбинации и отобраны камицицин-устойчивые клоны.

Полученные штаммы MG1655 *ΔybhB::gapA*^{WT} *ΔgapA*^{native::kan}, MG1655 *ΔybhB::gapA*^{D34K} *ΔgapA*^{native::kan} и MG1655 *ΔybhB::gapA*^{D34AG188TP189K} *ΔgapA*^{native::kan} обладали способностью расти как на богатой среде LB, так и на минимальной среде M9 с глюкозой в качестве единственного углеродного субстрата. Однако, как видно на рисунке 1, наличие мутантных генов *gapA* в локусе *ybhB* в качестве единственной копии *gapA* не было способно полностью супрессировать делецию нативного гена *gapA*, восстанавливая тем самым скорость роста до уровня штамма дикого типа.

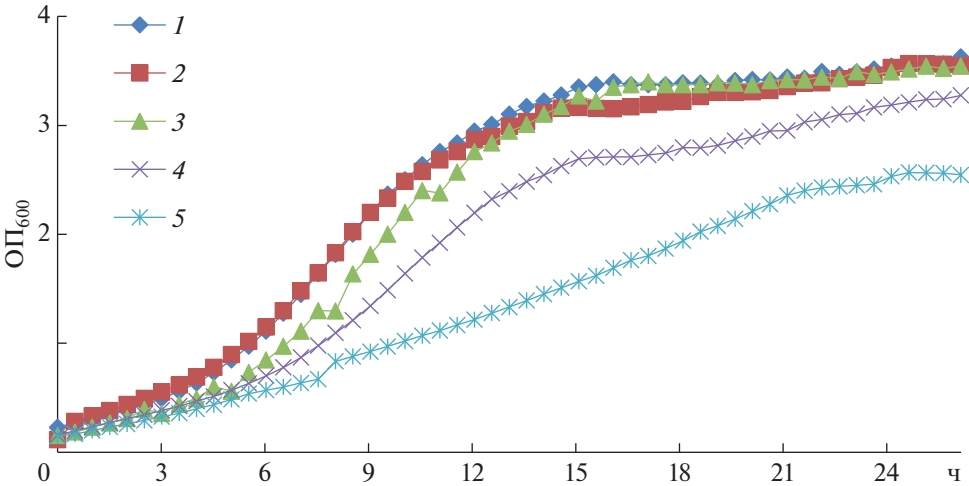


Рис. 1. Рост штаммов на минимальной среде с глюкозой в качестве единственного источника углерода (начальная оптическая плотность ОП600 составила): 1 – штамм MG1655; 2 – MG1655 $\Delta ybhB$; 3 – MG1655 $\Delta ybhB::P_{gapA-gapA^{WT}}\Delta gapA^{native}$; 4 – MG1655 $\Delta ybhB::P_{gapA-gapA^{D34K}}\Delta gapA^{native}$; 5 – MG1655 $\Delta ybhB::P_{gapA-gapA^{D34AG188TP189K}}\Delta gapA^{native}$.

Ацетилирование аминокислотных остатков лизина может происходить по двум механизмам: неферментативному и ферментативному, опосредованному ацетилтрансферазами. Единственным известным ферментом-ацетилтрансферазой у *E. coli* является пептидиллизин N-ацетилтрансфераза, кодируемая геном *patZ* (ранее *yfiQ*).

Независимо от того, по какому из двух механизмов происходит ацетилирование аминокислотного остатка лизина, сделать этот процесс обратимым способна деацетилаза CobV из сиртуинового семейства NAD⁺-зависимых деацетилаз, кодируемая геном *cobB*. CobV является гомологом эукариотических сиртуинов, регулирующих различные клеточные процессы, такие, как метаболизм, реакцию на стресс и старение.

Для проведения реакций ацетилирования и деацетилирования с помощью афинной металлохелатной хроматографии были очищены ферменты ацетилтрансфераза PatZ и деацетилаза CobV.

Ферменты добавляли в реакционную смесь к изучаемому белку ГАФД, после инкубирования данные ферменты удаляли из реакционной смеси, добавляя в раствор никелевую смолу. Удаление модифицирующих ГАФД ферментов PatZ и CobV из раствора контролировали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле, после чего во фракции свободного объема измеряли энзиматическую активность ГАФД. Результаты измерений НАД⁺-зависимой активности ГАФД штамма MG1655 *ybhB::P_{gapA-gapA}*ΔgapA::Km*, несущего плазмиды с мутантными генами *gapA* приведены в табл. 4.

In vitro обработка фермента ГАФД дикого типа ацетилтрансферазой PatZ приводила к двукратному увеличению ее ферментативной активности. При деацетилировании активность белка снижалась до уровня, близкого к исходному.

Наибольший интерес представляют показатели активности белков ГАФД^{D34AG188TP189K} и ГАФД^{D34K},

Таблица 4. НАД⁺-зависимая активность ГАФД штамма MG1655 *ybhB::P_{gapA-gapA}*ΔgapA::Km*, несущего плазмиды с мутантными *gapA* (представлены средние значения, полученные в трех независимых экспериментах)

Плазмида	НАД ⁺⁺ специфическая активность ГАФД, мкмоль мин ⁻¹ мг ⁻¹		
	нативная форма белка	ацетилированная форма белка	деацетилированная форма белка
pKK- <i>gapA</i> ^{wt}	520.7 ± 0.75	912.4 ± 0.57	637.1 ± 0.66
pKK- <i>gapA</i> ^{D34K}	20 ± 0.65	13.7 ± 0.54	26.4 ± 1.2
pKK- <i>gapA</i> ^{D34AG188TP189K}	139 ± 0.80	224 ± 0.40	121 ± 0.60

Таблица 5. НАДФ⁺-зависимая активность ГАФД штамма MG1655 *ybhB::P_{gapA}-gapA*ΔgapA::Km*, несущего плазмиды с мутантными *gapA* (представлены средние значения, полученные в трех независимых экспериментах)

Плаزمида	НАДФ ⁺ - специфическая активность ГАФД, мкмоль мин ⁻¹ мг ⁻¹		
	нативная форма белка	ацетилированная форма белка	деацетилированная форма белка
pKK- <i>gapA</i> ^{wt}	<0.01	<0.01	<0.01
pKK- <i>gapA</i> ^{D34K}	9 ± 0.45	18.2 ± 0.40	8.3 ± 0.25
pKK- <i>gapA</i> ^{D34AG188TP189K}	58.9 ± 0.36	56 ± 0.32	87.5 ± 0.44

имеющих потенциальный дополнительный сайт ацетилирования. Как видно из полученных данных, обработка мутантного фермента ГАФД^{D34K} ацетилтрансферазой PatZ *in vitro* приводила, в отличие от белка дикого типа, к уменьшению удельной активности прямой реакции, а деацетилирование увеличивало активность белка до величины, значительно превышающей исходное значение.

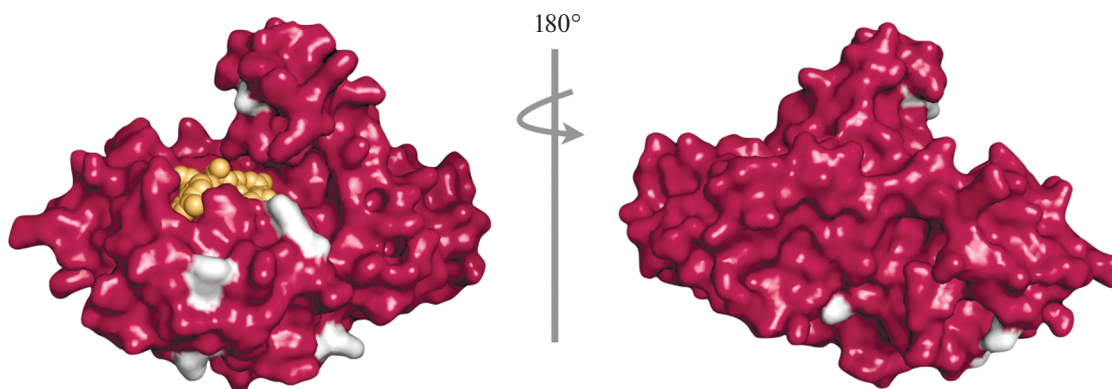
При ацетилировании мутантного фермента ГАФД^{D34AG188TP189K} активность, как и в случае белка дикого типа, увеличивалась (на 60%), а при деацетилировании снижалась. При этом достигнутое значение активности было несколько ниже, чем до ацетилирования, что может объясняться удалением не только дополнительной ацетильной группы, но и одной из ацетильных групп, исходно присутствовавших в белке дикого типа.

Поскольку мутантные ферменты ГАФД обладают двойной кофакторной специфичностью, нами была проанализирована их удельная активность при использовании НАДФ⁺ в качестве кофактора. Результаты измерений представлены в таблице 5.

Как мы видим из представленных таблиц, исследуемые белки демонстрировали различное сродство к кофакторам после ацетилирования.

Для идентификации ацетилированных аминокислотных остатков лизина после *in vitro* обработки целевых белков ГАФД ацетилтрансферазой PatZ был проведен масс-спектрометрический анализ. В белке ГАФД дикого типа было идентифицировано 6 сайтов ацетилирования. В случае белков с аминокислотными заменами было обнаружено еще два ацетилированных лизиновых остатка: в позиции 23 в белке GapA^{D34K} и в позиции 184 в случае белка GapA^{D34AG188TP189K}. На рисунке 2 серым цветом выделены ацетилированные аминокислотные остатки лизина на поверхности белка ГАФД.

Для глубокого понимания происходящих процессов были проведены процедура молекулярного докинга и анализ образованных комплексов белок-кофактор. На первом этапе были построены 3Д модели белков с аминокислотными заменами GapA^{D34AG188TP189K} и GapA^{D34K} с помощью сервера I-TASSER (см. Методика). С помощью методов молекулярного моделирования к аминокислотным остаткам лизина в определенных позициях были добавлены ацетильные группы, а полученные структуры были оптимизированы с помощью силового поля Charmm 36M (см. Методика).

**Рис. 2.** Распределение ацетилированных аминокислотных остатков лизина по белковой поверхности ГАФД.

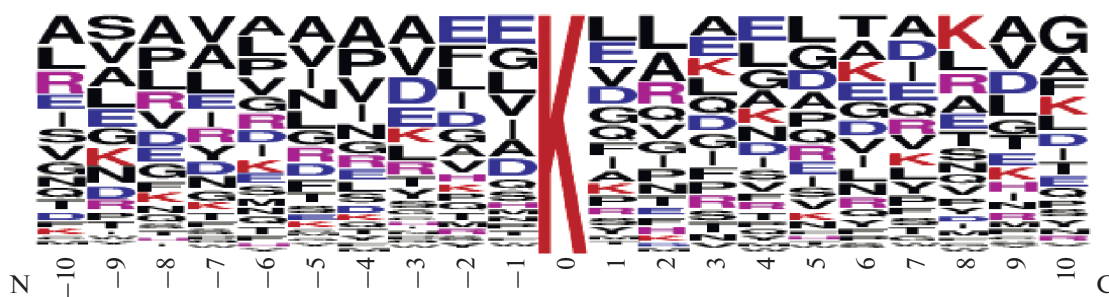


Рис. 3. Вероятностное распределение аминокислотных остатков в белках *E. coli* в непосредственной близости ацетилированных аминокислотных остатков лизина.

Данные молекулярного докинга отлично коррелировали с результатами измерений активности белков. Построенные в программе Docking-Server комплексы фермент-кофактор позволили объяснить изменения в значениях активности ферментов GapA^{D34AG188TP189K} и GapA^{D34K}. В случае белка GapA^{D34K} стабилизация образуемых связей с кофакторами обеспечена аминокислотными остатками лизина в позициях 124 и 192 для кофактора НАДФ⁺ и только аминокислотным остатком лизина в позиции 124, для кофактора НАД⁺.

Логотип консенсусной последовательности, показывающий аминокислотный состав в положениях от -10 до +10 относительно чувствительных к ацетилированию остатков лизина, был создан с использованием онлайн сервиса WebLogo [26] (рис. 3). Для его построения были использованы аминокислотные последовательности 100 белков *E. coli* из опубликованного протеомного анализа ацетилированных белков [5].

Равномерность распределения аминокислотных остатков лизина в пептидах была оценена с помощью критерия согласия Колмогорова. Данная метрика используется для сравнения эмпирической функции распределения остатков лизина в белковой последовательности с теоретической функцией равномерного распределения. Нулевая гипотеза состоит в том, что аминокислотные остатки лизина распределены равномерно по всей белковой последовательности. Альтернативная гипотеза состоит в том, что аминокислотные остатки лизина не распределены равномерно по белковой последовательности. Критерий Колмогорова вычисляет максимальное отклонение между двумя функциями распределения относительно стандартного распределения и преобразует его в *p*-value — вероятность получения отклонения при верности нулевой гипотезы. В данном случае было получено значение *p*-value, равное 1×10^{-6} , что свидетельствует об очень низкой вероятности равномерного распределения остатков лизина.

Поэтому была принята альтернативная гипотеза с уровнем значимости 95%, заключающаяся в том, что ацетилированные остатки лизина не распределены равномерно в пептидах, а имеется определенная закономерность в их окружении другими аминокислотными остатками. Для вычисления критерия Колмогорова была использована библиотека *scipy*, которая предоставляет различные статистические функции для Python.

Из полученной диаграммы вероятности аминокислотного окружения ацетилированного остатка лизина видно, что с наибольшей вероятностью в соседнем положении от ацетилированного остатка лизина находится аминокислотный остаток глутаминовой кислоты, который, вероятнее всего, служит основным катализатором для иницирования реакции ацетилирования, а через 4 аминокислоты с высокой степенью вероятности находится еще один аминокислотный остаток лизина, что и наблюдается как в случае белка GapA^{D34AG188TP189K}, так и в случае белка GapA^{D34K}.

Из сопоставления полученных данных масс-спектрометрии и анализа аминокислотных последовательностей белков можно сделать вывод, что аминокислотные замены на лизин в позициях 34 и 189 обеспечивают необходимое окружение для создания дополнительных сайтов ацетилирования в позициях 23 и 184 соответственно.

Обнаруженный способ влияния на энзиматическую активность представляет собой потенциальный механизм регулирования энергетического статуса клетки, так как в процессе ацетилирования задействованы ацетил-КоА и НАД⁺ — две молекулы, которые непосредственно участвуют в метаболических процессах. Такого рода метаболическая регуляция посредством ацетилирования может быть консервативным механизмом у разных организмов.

В этой работе мы наглядно продемонстрировали влияние процесса ацетилирования на актив-

ность ключевого фермента центрального метаболизма ГАФД и двух его мутантных вариантов с дополнительными сайтами ацетилирования.

Изучение процесса ацетилирования имеет значение для многих аспектов биохимии и биотехнологии и играет важную роль в понимании молекулярных механизмов, влияющих на активность ферментов, особенно тех, которые приводят к перераспределению потоков клеточного метаболизма. На сегодняшний день для изучения ацетилирования белков используются современные технологии протеомики, которым помогают как высокопроизводительные, так и экспериментальные методы с высоким разрешением. Однако детальное изучение механизмов остается актуальной задачей.

В работе использовали оборудование (масс-спектрометр, “Burker”, Германия) центра коллективного пользования “Промышленные биотехнологии” ФИЦ Биотехнологии РАН.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках программы по развитию генетических технологий на 2019–2027 гг. (Соглашение № 075-15-2021-1071)

Н.С. Плеханова — концепция, проведение экспериментов; Н.С. Плеханова, И.Б. Альтман — обсуждение результатов исследования, написание текста; М.С. Юркова — редактирование текста статьи; А.Н. Федоров — руководство работой.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kuhn M.L., Zemaitaitis B., Hu L.I., Sahu A., Sorensen D., Minasov G. et al. // PLoS ONE. 2014. V. 9. № 4. P. e94816. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094816>
2. Wang Q., Zhang Y., Yang C., Xiong H., Lin Y., Yao J. et al. // Science. 2010. V. 327. P. 1004–1007.
3. Verdin E., Ott M. // Molecular Cell. 2013. T. 51. № 2. C. 132–134.
4. Slivinskaya E.A., Plekhanova N.S., Altman I.B., Yampolskaya T.A. // Microorganisms. 2022. V. 10. P. 976. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10050976>
5. Schilling B., Basisty N., Christensen D.G., Sorensen D., Orr J.S., Wolfe A.J. et al. // J. Bacteriol. 2019. V. 201. № 9. <https://doi.org/10.1128/JB.00768-18>
6. Castaño-Cerezo S., Bernal V., Post H., Fuhrer T., Cappadona S., Sánchez-Díaz N.C. et al. // Molecular Systems Biology. 2014. V. 10. P. 762. <https://doi.org/10.15252/msb.20145227>
7. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd. ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 1625 p.
8. Thomason L.C., Costantino N., Court D.L. // CP Molecular Biology. 2007. V. 79. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb0117s79>
9. Datsenko K.A., Wanner B.L. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. V. 97. P. 6640–6645.
10. Lamed R., Zeikus J.G. // J. Bacteriol. 1980. V. 141. P. 1251–1257.
11. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685.
12. Song L., Wang G., Malhotra A., Deutscher M.P., Liang W. // Nucleic Acids Res. 2016. V. 44. P. 1979–1988.
13. Wittig I., Karas M., Schägger H. // Molecular & Cellular Proteomics. 2007. V. 6. P. 1215–1225.
14. Zhou X., Zheng W., Li Y., Pearce R., Zhang C., Bell E.W. et al. // Nat Protoc. 2022. V. 17. № 10. P. 2326–2353.
15. Brooks B.R., Bruccoleri R.E., Olafson B.D., States D.J., Swaminathan S., Karplus M. // J. Comput. Chem. 1983. V. 4. P. 187–217.
16. Bikadi Z., Hazai E. // J. Cheminform. 2009. V. 1. P. 15. <https://doi.org/10.1186/1758-2946-1-15>
17. Halgren T.A. // Encyclopedia of Computational Chemistry. UK: John Wiley & Sons, 2002. <https://doi.org/10.1002/0470845015.cma012m>
18. Xia L., Kong X., Song H., Han Q., Zhang S. // Plant Communications. 2022. V. 3. P. 100266. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2021.100266>
19. Okanishi H., Kim K., Masui R., Kuramitsu S. // J. Proteome Res. 2013. V. 12. P. 3952–3968.
20. Smith K., Shen F., Lee H.J., Chandrasekaran S. // iScience. 2022. V. 25. P. 103730. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.103730>
21. Ketema E.B., Lopaschuk G.D. // Front. Cardiovasc. Med. 2021. V. 8. P. 723996. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2021.723996>
22. Li T., Liu M., Feng X., Wang Z., Das I., Xu Y. et al. // J. Biol. Chem. 2014. V. 289. P. 3775–3785.
23. Ventura M., Mateo F., Serratos J., Salaet I., Carujo S., Bachs O. et al. // Int. J. Biochem. Cell Biol. 2010. V. 42. P. 1672–1680.
24. Zhang H., Zhao Y., Zhou D.X. // Nucleic Acids Research. 2017. V. 45. P. 12241–12255.
25. Baba T., Ara T., Hasegawa M., Takai Y., Okumura Y., Baba M., Datsenko K.A. et al. // Molecular Systems Biology. 2006. V. 2. P. 2006. <https://doi.org/10.1038/msb4100050>
26. Crooks G.E., Hon G., Chandonia J.-M., Brenner S.E. // Genome Res. 2004. V. 14. P. 1188–1190.

Effect of N ϵ -acetylation on the Enzymatic Activity of *Escherichia coli* Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase

N. S. Plekhanova^{a, *}, I. B. Altman^b, M. S. Yurkova^a, and A. N. Fedorov^a

^a Federal Research Centre «Fundamentals of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

^b MIREA – Russian Technological University, Moscow, 119454 Russia

*e-mail: plekhanovans@mail.ru

The regulation of cellular metabolism is a topic of interest for both fundamental and applied science, as the findings can be used in various biotechnological industries. One of the universal regulatory mechanisms that affects most cellular processes is the acetylation of lysine residues in central metabolic enzymes, such as glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. In this work, we investigated the effect of acetylation and deacetylation on the activity of both wild type and mutant *E. coli* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. We found that *in vitro* acetylation of wild-type GAPDH by PatZ acetyltransferase increased its enzymatic activity by twofold, while subsequent deacetylation restored the activity to initial level. For mutant forms of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, we demonstrated that the introduction of additional acetylation sites due to mutations altered the impact of acetylation/deacetylation processes on glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity. Our data suggest a re-evaluation of the role of acetylation in regulating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity and its involvement in *E. coli* metabolism.

Keywords: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, acetylation, acetyltransferase, deacetylase, regulation of GAPDH activity