

УДК 577.15

## ФИКСАЦИЯ МОНОМЕРНОЙ ФОРМЫ ФОРМИАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В СИСТЕМЕ ОБРАЩЕННЫХ МИЦЕЛЛ ПУТЕМ МОДИФИКАЦИИ ФЕРМЕНТА ГЛЮКОЗОЙ

Д. Н. Трофимова, А. В. Левашов\*

(кафедра энзимологии химического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова; Воробьевы горы, Москва 119899, Россия; тел.: 939-34-29)

Проведено сравнительное изучение нативной и модифицированной глюкозой формиатдегидрогеназы из метилотрофных бактерий *Pseudomonas sp. 101* в системе обращенных мицелл Аэрозоля ОТ в октане. На кривой зависимости каталитической активности нативного фермента от степени гидратации ПАВ (размеров внутренней полости мицелл) обнаружены два максимума, отвечающие функционированию фермента в форме мономера и димера. В результате химической модификации фермента глюкозой обнаружено, что максимум, соответствующий димерной форме фермента исчезает и фермент функционирует только в форме мономера с оптимумом при  $W_0 = 22$ .

Реакцию окисления формиат-иона до углекислого газа катализирует NAD-зависимая формиатдегидрогеназа при сопряженном восстановлении  $\text{NAD}^+$  в  $\text{NADH}$  [1]. Фермент состоит из двух идентичных субъединиц, имеет два независимых активных центра, молекулярная масса ферментов из различных источников колеблется от 36 до 48 кДа [2]. В водных растворах фермент функционирует в виде димера.

Мицеллы – удобный инструмент для изучения олигомерного состава ферментов [3]. Мономерные ферменты имеют, как правило, колоколообразную зависимость каталитической активности от степени гидратации ПАВ [4–7]. Существование оптимума обусловлено тем, что в этих условиях реализуется совпадение диаметра внутренней полости мицеллы с молекулярными размерами включенного в нее фермента (принцип геометрического соответствия) [3–7]. Олигомерные ферменты имеют пилообразный профиль, где каждой структурной форме фермента отвечает свой максимум каталитической активности [4].

В системе обращенных мицелл формиатдегидрогеназа (ФДГ) диссоциирует и функционирует в формах мономера, димера и октамера [8, 9].

Полагая, что в олигомеризации ферментов важную роль играют белок-белковые взаимодействия субъединиц, мы предприняли гидрофиллизацию фермента путем его модификации углеводами (глюкозой) для последующего изучения кинетического поведения фермента в системе обращенных мицелл.

### Реагенты

ФДГ из метилотрофных бактерий *Pseudomonas sp 101*, полученная по методике [1]. Никотинамидадениндинуклеотид ( $\text{NAD}^+$ ) («Sigma», США, без дополнительной очистки, чистота  $\geq 98\%$ ). Чистоту определяли по реакции с формиатдегидрогеназой. Натриевая соль муравьиной кислоты (формиат натрия) («Реахим», Россия, «ос.ч.»). Натриевая соль ди-(2-этил)гексилевого эфира сульфоянтарной кислоты (Аэрозоль ОТ, АОТ) («Merck», Германия). *n*-Октан («ч.д.а.»), абсолютированный над натрием и очищенный перегонкой. D-(+) глюкоза («Sigma», США). Боргидрид натрия («Sigma», США).

### Типичный кинетический эксперимент

К 2 мл 0,1 М раствора АОТ в октане добавляли фосфатный буфер (20 мМ рН 8,0), 10 мкл 0,3 М водного раствора  $\text{NAD}^+$ , 10 мкл раствора фермента (исходные концентрации препаратов фермента варьировали в пределах от 21,5 до 56,8 мкМ) и встряхивали до получения гомогенного оптически прозрачного раствора. Реакцию инициировали введением 5–100 мкл 0,3 М раствора формиата натрия. За реакцией следили спектрофотометрически, регистрируя кинетику накопления образующегося  $\text{NADH}$  ( $\epsilon = 6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) при 340 нм, 25°. В работе использовали спектрофотометр «Shimadzu UV 265FW».

### Получение модифицированного препарата ФДГ

К 1 мл 2,5 мкМ раствора ФДГ в фосфатном буфере (рН 8,0) добавляли 30 мкл 0,25 М раствора глюкозы. Реакцию проводили при постоянном перемешивании ( $T = 25^\circ$ ). Через 24 ч добавляли 10 мкл 5 мг/мл раствора  $\text{NaNH}_4$  для восстановления основания Шиффа. После завершения реакции модифицированную ФДГ отделяли от низкомолекулярных реагентов методом гель-фильтрации. Работы по очистке препаратов белка проводили на хроматографической системе низкого давления фирмы («Bio-Rad», США) на колонке с *Sephadex G-25 (fine)*, уравновешенной фосфатным буфером (20 мМ, рН 8,0) с ЭДТА (20 мМ). Содержание белка контролировали по поглощению при 280 нм.

### Результаты и их обсуждение

Зависимость каталитической активности ФДГ от степени гидратации ПАВ в системе обращенных мицелл Аэрозоля ОТ в октане приведена на рис. 1, где показано, что зависимость представляет собой кривую с двумя четко выраженными максимумами. Два оптимума наблюдаются при степенях гидратации 16 и 31. Эти значения соответствуют функционированию мономерной и димерной форм ФДГ.

Степень гидратации АОТ в октане однозначно определяет размер внутренней полости мицелл [10, 11]. Используя ранее полученную корреляцию, можно определить, что приведенным выше степеням гидратации соответству-

\*Адресат для переписки.

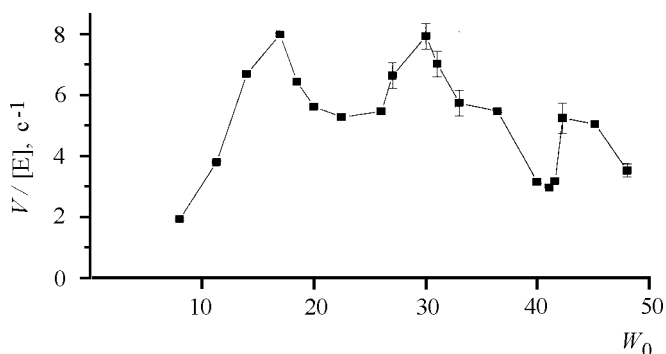


Рис. 1. Зависимость каталитической активности ФДГ в системе обращенных мицелл АОТ в октаноле от степени гидратации ПАВ. Условия эксперимента: 0,1М АОТ в октаноле, в качестве полярной фазы внутренней полости мицеллы использован фосфатный буфер (20 мМ, рН 8,0); [NAD<sup>+</sup>] = 1,5 мМ, [FORM] = 0,75 – 6,0мМ, [ФДГ] = 25,8 нМ; T = 25°

ют значения диаметра внутренней полости мицелл, равные 56 и 101 Å соответственно. Сопоставляя размеры мицеллярной матрицы с линейными размерами димерной молекулы ФДГ (100×66×60 Å) [1], можно видеть, что в условиях второго оптимума наблюдается совпадение диаметра мицеллы и большой оси молекулы фермента. Согласно концепции геометрического соответствия, предложенной ранее [3, 7], именно при таких условиях и наблюдается максимум на зависимости каталитической активности ферментов от степени гидратации ПАВ. Что касается первого максимума, то диаметр внутренней полости мицеллы при степени гидратации 16, равный 50 Å находится в хорошем соответствии с размерами сферической молекулы белка с молекулярной массой 44 кДа. Именно такая молекулярная масса одной субъединицы молекулы ФДГ. Таким образом, в системе обращенных мицелл Аэрозоля ОТ в октаноле ФДГ способна диссоциировать на субъединицы [8].

После гликозилирования формиаатдегидрогеназы профиль зависимости каталитической активности от степени гидратации ПАВ принципиально меняется.

На рис. 2 представлена зависимость каталитической активности от степени гидратации, которая имеет колоколообразный вид с одним максимумом при  $W_0 = 22$ . Эта ве-

личина соответствует функционированию мономерной формы модифицированной ФДГ.

Диаметр мономера модифицированной ФДГ составляет 70 Å и складывается из размера белковой глобулы и длины глюкозного остатка, такой же размер имеет внутреннюю полость мицелл при степени гидратации 21.

Таким образом, в работе обнаружено, что ФДГ способна в мягких условиях в системе обращенных мицелл диссоциировать на каталитически активные субъединицы. Функционированию каждой олигомерной формы фермента соответствует характерный максимум на зависимости каталитической активности от степени гидратации ПАВ. Исчезновение максимума, характерного для димера ФДГ, говорит о том, что модификация ФДГ гидрофиллизацией поверхности белка стабилизирует мономерную форму фермента и препятствует агрегации субъединиц в системе обращенных мицелл.

В дальнейшем мы предполагаем выявить роль степени модификации и размера модифицирующего агента в способности ФДГ к диссоциации и олигомеризации.

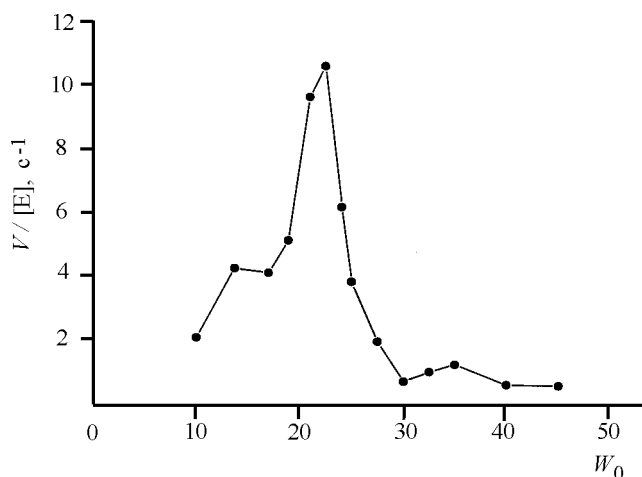


Рис. 2. Зависимость каталитической активности ФДГ, модифицированной глюкозой в системе обращенных мицелл АОТ в октаноле, от степени гидратации ПАВ

Работа была частично финансирована грантом израильского правительства.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Egorov A.M., Avilova, T.V., Dickov, M.M., Popov, V.O., Rodionov Yu.V., Berezin I.V. // Eur. J. Biochem. 1979. **99**. P. 569.
- Popov, V.O., Lamzin, V.S. // Biochem. J. 1994. **301**. P. 625.
- Левашов А.В. Биотехнология (Итоги науки и техники ВИНТИ АН СССР), М., 1987. **4**. С. 112.
- Kabanov A.V., Klyachko N.L., Nametkin S.N., Merkel S.K., Zaroza A.V., Bunik V.I., Ivanov M.V., Levashov A.V. // Prot. Eng. 1991. **4**. P. 1009.
- Pshezhetsky A.V., Levashov A.V., Wiederschain G. Ya. // Biochim. Biophys. Acta. 1992. **1122**. P. 154.
- Kabanov A.V., Nametkin S.N., Evtushenko G.N., Chernov N.N., Klyachko N.L., Levashov A.V., Martinek K. // Biochim. Biophys. Acta. 1989. **996**. P. 147.
- Klyachko N.L., Levashov A.V., Kabanov A.V., Khmel'nitsky Yu.L., Martinek K. / Kinetics and catalysis in microhetero-geneous systems. N.Y., 1991. P. 135.
- Клячко Н.Л., Вакула С.В., Гладышев В.Н., Тишков В.И., Левашов А.В. Биохимия. 1997. **62**. С. 1683.
- Мартинек К., Левашов А.В., Клячко Н.Л., Хмельницкий Ю.Л., Бerezin И.В. // Биологические мембраны. 1985. **2**. С. 669.
- Zulauf M., Eicke H.-F. // J. Phys. Chem. 1979. **83**. P. 480.
- Клячко Н.Л., Пшежецкий А.В., Кabanov A.V., Вакула С.В., Мартинек К., Левашов А.В. // Биол. мембраны. 1990. **7**. С. 467.

Поступила в редакцию 20.06.00