

УДК 577.15.02

РОЛЬ ОСТАТКОВ ПРОЛИНА В СТАБИЛЬНОСТИ ПРОКАРИОТИЧЕСКИХ И ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ ФОРМИАТДЕГИДРОГЕНАЗ

А.Е. Серов, В.И. Тишков

(Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, кафедра химической энзимологии; e-mail: vit@enz.chem.msu.ru)

Введение дополнительных остатков пролина методом направленного мутагенеза представляет собой один из распространенных методов повышения термостабильности белков. Изучено влияние подобных мутаций на стабильность NAD^+ -зависимых формиатдегидрогеназ (ФДГ; КФ 1.2.1.2) из метилотрофных бактерий *Pseudomonas* sp.101 и пекарских дрожжей. В случае бактериальной ФДГ данный метод не может быть использован. Низкая стабильность ФДГ пекарских дрожжей, вероятно, связана с невысоким содержанием в ней остатков пролина. Однако замена G141P не привела к повышению термостабильности этого фермента. В отличие от ФДГ из бактерий стабилизация фермента пекарских дрожжей возможна за счет увеличения жесткости полипептидной цепи.

Жесткость полипептидной цепи является одним из важных факторов, определяющих термостабильность ферментов. По своим конформационным свойствам от других аминокислот наиболее сильно отличается Pro, поскольку его боковая цепь ковалентно связана с атомом азота предшествующей пептидной связи [1]. Пятичленное пирролидиновое кольцо накладывает жесткие ограничения на вращение вокруг N–C α -связей. В полипептидной цепи у Pro меньше степеней свободы и этот остаток характеризуется более низкими значениями конформационной энтропии, чем другие аминокислоты.

Благодаря своим структурным особенностям остаток Pro может стабилизировать белки, жестко фиксируя их нативную конформацию. По всей видимости, стабилизирующий эффект обусловлен падением конформационной энтропии процесса денатурации [2]. Сравнение олиго-1,6-глюкозидаз [3], алкогольдегидрогеназ [4], 3-изопропилмалатдегидрогеназ, пуллулоназ и неопуллулоназ [5] из мезофильных и термофильных источников показало, что белки из термофилов содержат больше Pro в неструктурированных участках, β -изгибах и α -спиралях по сравнению со своими аналогами из мезофилов. Остатки Pro существенно влияют на термостабильность алкогольдегидрогеназы [6] и триозофосфатизомеразы [7] из *Bacillus stearothermophilus*, β -лактамазы TEM-1 [8], дрожжевой фосоглицераткиназы [9], аденилаткиназы [10] и субтилизина E [11].

В связи с биотехнологической ценностью NAD^+ -зависимых формиатдегидрогеназ (ФДГ; КФ 1.2.1.2) большое значение имеет термостабильность ферментов этой группы [12]. Из изученных на сегодняшний день ФДГ наиболее стабильным является фермент из метилотрофных бактерий *Pseudomonas* sp.101 (PseФДГ) [13], а наименее стабильным – фермент из пекарских дрожжей

(SceФДГ) (неопубликованные данные). Термостабильность ФДГ коррелирует с содержанием в ней остатков Pro. В PseФДГ находится 24 Pro, в ФДГ из метилотрофных дрожжей *Candida boidinii* и *Candida methylca*, обладающих промежуточной термостабильностью [14, 15], – 14, а в SceФДГ – всего 12 Pro. В данной работе на примере PseФДГ и SceФДГ изучена возможность стабилизации формиатдегидрогеназ при введении в них дополнительных остатков Pro. Соответствующие гены ранее были нами клонированы и экспрессированы в клетках *E. coli*, что позволило проводить эксперименты по белковой инженерии данных ферментов.

Методы исследования

В работе использовали ДНК-полимеразу, ДНК-лигазу, полинуклеотидкиназу фага T4 и эндонуклеазы рестрикции фирмы “New England Biolabs” и Pwo ДНК-полимеразу фирмы “Boehringer Mannheim”. Все реактивы, использованные для генно-инженерных манипуляций, были марки “Molecular Biology Grade” (*Sigma*). В кинетических экспериментах использовали NAD^+ (99% чистоты, *Sigma*) и формиат натрия (“ч.д.а.”, *Reaxim*).

Направленный мутагенез ФДГ из бактерий *Pseudomonas* sp.101 осуществляли по модифицированному методу Кункеля, как описано ранее [13]. В ФДГ пекарских дрожжей аминокислотную замену вводили с помощью двухстадийной полимеразной цепной реакции, как описано в [16], используя Pwo ДНК-полимеразу. Мутанты ФДГ и рекомбинантные ферменты дикого типа, экспрессированные в клетках *E. coli*, выделяли и очищали по стандартной методике, разработанной для бактериальной ФДГ [17]. Полученные препараты фермента были не менее 90–95% чистоты согласно данным аналитического

электрофореза в 12%-м полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия.

Активность формиатдегидрогеназы определяли спектрофотометрически по накоплению NADH при длине волны 340 нм ($\epsilon_{340} = 6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) на спектро-фотометре *Schimidzu UV 1601PC* при 25° в 0,1 М калий-фосфатном буфере (рН 7,0). Концентрация NAD^+ и формиата натрия в кювете составляла 1,5 мМ и 0,3 М соответственно.

Термостабильность мутантов ФДГ и рекомбинантных ферментов дикого типа измеряли в 0,1 М калий-фосфатном буфере (рН 7,0). Для каждой формы ФДГ готовили серию образцов: по 100 мкл раствора фермента (0,2 мг/мл) в каждой из 20 пластиковых пробирок объемом 1,5 мл. Пробирки помещали в предварительно прогретый до необходимой температуры водный термостат (точность термостатирования $\pm 0,1^\circ$). В моменты отбора проб пробирки с ферментными препаратами переносили в лед на 5 мин. Константу скорости термоинактивации бактериальной ФДГ и ее мутанта ($k_{\text{ин}}$) определяли из зависимости остаточной активности A/A_0 от времени в координатах $\ln(A/A_0) - t$ (мин) с помощью метода линейной регрессии в программе *Sigma plot 2000*.

Анализ трехмерной структуры нативной ФДГ из *Pseudomonas* sp.101 проводили с помощью программы *RasMol 2.7*.

Результаты экспериментов

В литературе существует ряд примеров увеличения термостабильности белков методом направленного мутагенеза при заменах остальных 19 аминокислот на остатки Pro. Введение Pro привело к стабилизации лизоцима фага T4 [18, 19], лизоцима человека [20], лизоцима цыпленка [21], протеазы из *Bacillus* sp. [22], рибонуклеазы III bp *E. coli* [23, 24], легкой цепи иммуноглобулина мыши [25] и термолизин-подобной протеазы из *Bacillus stearothermophilus* [26].

В олиго-1,6-глюкозидазу из *Bacillus cereus* [3, 5] последовательно вводили девять мутаций: X \rightarrow Pro: по три замены в β -изгибах, на N-концах α -спиралей и в неструктурированных участках. Термостабильность мутантов аддитивно возрастала с увеличением количества Pro. Полученные результаты позволили авторам сформулировать так называемое “пролиновое правило” для стабилизации белков. Данное правило включает в себя два основных положения. Во-первых, важные для термостабильности остатки Pro, как правило, расположены в $(i+1)$ -м положении β -изгибов и первом положении α -спиралей. Во-вторых, стабилизирующие эффекты этих Pro независимы и аддитивны.

ФДГ из *Pseudomonas* sp.101 (PseФДГ) превосходит по термостабильности все свои изученные аналоги из бактерий и дрожжей [13]. Широко распространенный метод стабилизации, основанный на сравнении аминокислотных последовательностей данного фермента и его аналогов из термофилов, в данном случае не подходит. Для повышения термостабильности PseФДГ необходимо опираться исключительно на общие подходы к стабилизации белков, которые только начинают формироваться благодаря накопленным в последние 15–20 лет экспериментальным данным. Данные PCA [27] позволяют проводить моделирование и анализ аминокислотных замен в белковой глобуле PseФДГ. Ранее этот фермент уже успешно стабилизировали методом гидрофобизации α -спиралей [13]. Предложенное в [3] “пролиновое правило” может рассматриваться как еще один подход к повышению устойчивости PseФДГ к тепловой денатурации.

Каждая субъединица димерной молекулы фермента содержит 17 β -изгибов. В $(i+1)$ -м положении большинства из них расположен либо Pro, либо другой, но консервативный аминокислотный остаток. Однако в изгибе, сформированном 111–114 остатками, вторую позицию занимает неконсервативный Lys. В некоторых бактериальных ФДГ этот Lys заменен на остаток Pro (рис. 1, а). Величина двугранных углов ϕ и ψ остатка Lys-112

	$\alpha 3$	$\beta 7$		$\alpha 5$
	<----->	...<----->		<----->
PseФДГ	¹⁰⁴ TPERIAKAK KN LKLALTA ¹²⁰	PseФДГ	¹⁶⁵ YLP PS HEWARKG ¹⁷⁵	
MorФДГ	TAERIAKAK PK LKLALTA	MorФДГ	YI PS HDWARG	
SauФДГ	TRERIEKAK PN LKLALTA	SceФДГ	¹³⁹ Y NG GHQQAING ¹⁴⁹	
ParФДГ	TAERIAKAK PK LKLALTA	CmeФДГ	FV PA HEQIINH	
HypФДГ	TAERIAKAK PK LKMIVTA	CboФДГ	FV PA HEQIINH	
	а		б	

Рис. 1. а – Аминокислотные последовательности бактериальных ФДГ в районах α -спирали 3 и β -цепи 7. PseФДГ – *Pseudomonas* sp.101 [SWISS-PROT:FDH_PSESR], MorФДГ – *Moraxella* C-1 [EMBL Accession Y13245], SauФДГ – *Staphylococcus aureus* [Gene Bank Accession AP003358], ParФДГ – *Paracoccus* sp. 12-A [Gene Bank Accession AB071373], HypФДГ – *Hyphomicrobium* sp.JC17 [Gene Bank Accession AB051073]. б – аминокислотные последовательности ФДГ из бактерий и дрожжей в районе α -спирали 5. SceФДГ – пекарские дрожжи [EMBL Accession Z75296], CmeФДГ – *C. methylica* [EMBL Accession X81129], CboФДГ – *C. boidinii* [EMBL Accession AJ245934].

Структурные элементы относятся к PseФДГ

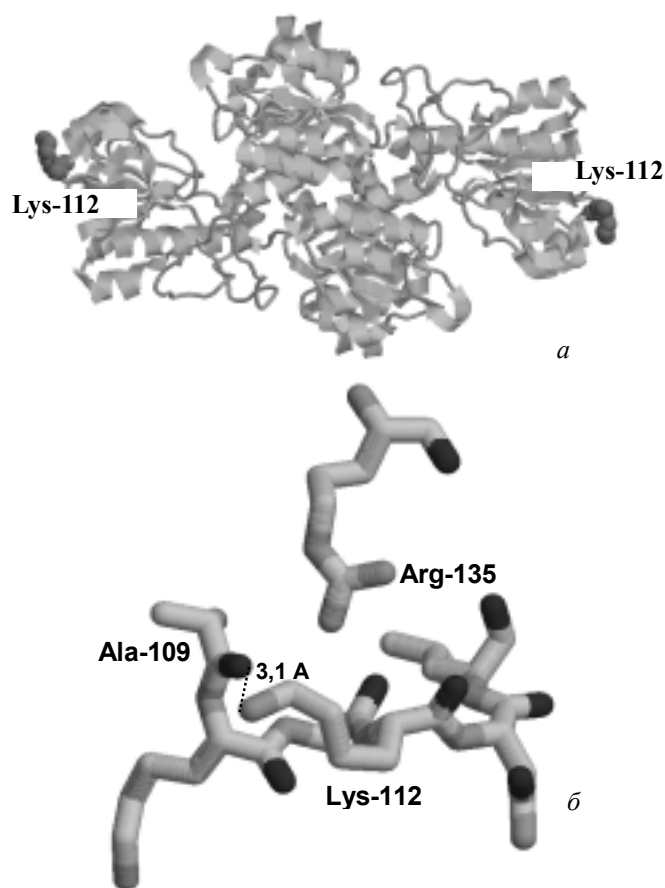


Рис. 2. Апо-форма PseFDG (а); структура апо-формы PseFDG в районе остатка Lys-112 (б). Пунктиром обозначена водородная связь между аминогруппой Lys-112 и карбонильным кислородом основной цепи остатка Ala-109

составляет -62° и -30° соответственно. Эти значения характерны для Pro [1]. Остаток Lys-112 расположен на поверхности белковой глобулы (рис. 2, а). На расстоянии 5,3 Å от аминогруппы Lys-112 находится положительно заряженная гуанидиновая группа Arg-135 (рис. 2, б). Взаимное отталкивание двух одинаковых зарядов может отрицательно влиять на термостабильность белка. Боковая цепь Lys-112 образует водородную связь с карбонильным кислородом Ala-109. Соответствующее расстояние между атомами азота и кислорода составляет 3,1 Å. Таким образом, замена K112P будет оказывать как стабилизирующее, так и дестабилизирующее действие на PseFDG. Суммарный эффект можно определить только экспериментальным путем.

Кристаллическая структура ФДГ пекарских дрожжей (SceFDG) неизвестна. Отсутствие структурных данных затрудняет применение для стабилизации этого фермента общих теоретических подходов, поскольку все они основаны на анализе структуры белка. Однако SceFDG можно стабилизировать, сравнивая ее аминокислотную последовательность с более термостабильными аналогами. Такое сравнение показало, что полипептидная цепь

SceFDG обладает повышенной гибкостью. Несколько консервативных остатков Pro в белке пекарских дрожжей заменены на другие аминокислоты. Например, в 141-м положении аминокислотной последовательности SceFDG расположен Gly. В большинстве остальных формилатдегидрогеназ эта позиция занята остатком Pro (рис. 1, б). В частности Pro содержат более термостабильные ФДГ из бактерий *Pseudomonas* sp.101 и *Moraxella C-1*, а также дрожжей *C. boidinii* и *C. methylica*.

Для выяснения влияния остатков в 112-м и 141-м положениях последовательностей PseFDG и SceFDG на термостабильность этих ферментов были получены точечные мутанты PseFDG K112P и SceFDG G141P и изучены их свойства. Результаты экспериментов представлены на рис. 3. Инактивацию бактериальной ФДГ и ее мутанта изучали при 63° . Процесс термоденатурации PseFDG описывается кинетикой необратимой реакции первого порядка [13]. Для сравнения термостабильности PseFDG дикого типа и мутанта K112P использовали отношение соответствующих констант инактивации ($k_{ин}$). Оказалось, что введенная мутация привела к дестабилизации бактериальной ФДГ (рис. 3, а). Константа инактивации мутанта $((13 \pm 3) \times 10^{-4} \text{ с}^{-1})$ в 1,6 раза выше константы инактивации немутантной PseFDG $((8 \pm 2) \times 10^{-4} \text{ с}^{-1})$. ФДГ пекарских дрожжей имеет более сложный двухстадийный механизм инактивации, первая стадия которого обратима (неопубликованные данные). В связи с этим устойчивость SceFDG дикого типа и мутанта G141P к тепловой денатурации сравнивали по периодам полуинактивации ($t_{1/2}$) при $42,5^\circ$. При данной температуре за время проведения эксперимента фиксируются как первая, так вторая стадии процесса. Мутация G141P не вызвала изменения термостабильности SceFDG (рис. 3, б). Период полуинактивации при $42,5^\circ$ для обеих форм дрожжевого фермента составил 2,5 мин.

Обсуждение результатов

Полученные результаты позволяют сделать вывод, что “пролиновое правило” не может быть использовано для стабилизации PseFDG. В большинстве своих β -изгибов и начальных участков α -спиралей PseFDG уже содержит остатки Pro или непролиновые консервативные аминокислоты, замена которых, скорее всего, резко ухудшит кинетические свойства фермента. В случае Lys-112 водородная связь боковой группы данного остатка с основной цепью Ala-109, очевидно, более важна для термостабильности белка, чем конформационная устойчивость β -изгиба 111–114. Следует отметить, что в литературе уже встречались работы, которые не согласуются с “пролиновым правилом”. На основе анализа первичных структур алкогольдегидрогеназ из мезофилов *Clostridium beijerinckii* и гипертермофилов *Thermoanaerobacter brockii* в мезофильный фермент ввели восемь дополнительных Pro [4]. Наилучшие резуль-

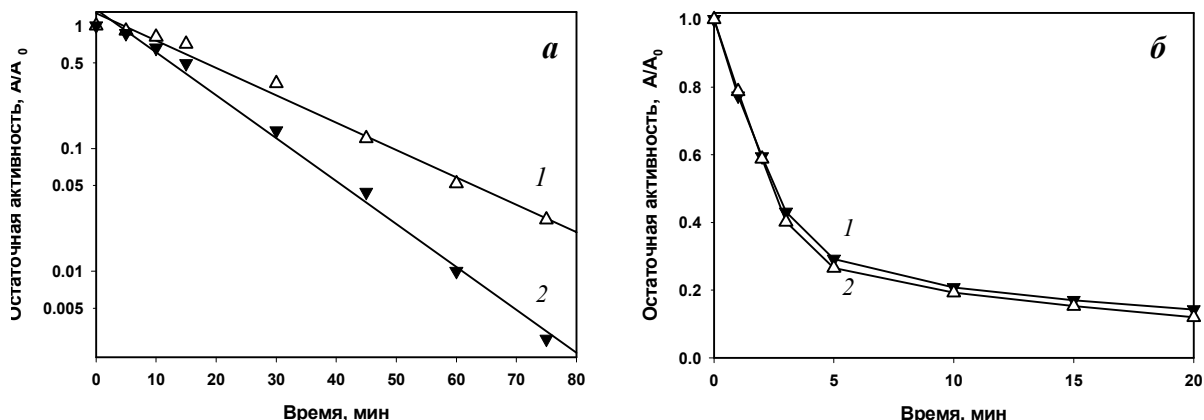


Рис. 3. *a* – Зависимость остаточной активности PseФДГ дикого типа (1) и мутанта K112P (2) от времени в координатах $\ln(A/A_0) - t$; *б* – зависимость остаточной активности SceФДГ дикого типа (1) и мутанта G141P (2) от времени в координатах $A/A_0 - t$ (0,1 М калий фосфатный буфер, pH 7,0; температура 63° (*a*) и 42,5° (*б*))

таты дали замены в β -изгибе и неструктурированном участке, а мутации в первых положениях α -спиралей привели к дестабилизации белка. Кроме того, не наблюдалось аддитивности вкладов точечных мутаций в суммарный стабилизирующий эффект.

Задача дальнейшей стабилизации бактериальной ФДГ требует поиска других подходов. Это может быть вытеснение молекул воды из гидрофобных полостей внутри белковой глобулы, создание дополнительных ионных пар и водородных связей. Возможно применение метода, противоположного в своей основе “пролиновому правилу”, – снятие конформационных напряжений в белковой глобуле при увеличении гибкости полипептидной цепи. Предварительный анализ структуры выявил в PseФДГ несколько аминокислотных остатков в неоптимальной конформации. Замена этих остатков на Gly позволит снять конформационное напряжение в молекуле белка, так как в полипептидах Gly обладает гораздо большим набором разрешенных конформаций по сравнению с остальными аминокислотами. Замена G141P также не привела к повышению

термостабильности SceФДГ. Соответствующий Gly-141 остаток Pro занимает третье положение в α -спирали 5 структуры PseФДГ. Как уже было упомянуто выше, в начале спиральных участков Pro оказывает стабилизирующее действие на белки. Напротив, в середине α -спиралей этот остаток практически не встречается, поскольку у него отсутствует атом водорода, необходимый для формирования внутриспиральной водородной связи [1]. По всей видимости, в третьем положении спирали Pro не влияет существенно на термостабильность. Спираль сама по себе является достаточно стабильным элементом вторичной структуры и не нуждается в дополнительном увеличении жесткости. Тем не менее в случае ФДГ пекарских дрожжей остаются перспективы стабилизации этого фермента за счет введения дополнительных остатков Pro. Интересными кандидатами для замены представляются остатки Lys-299 и Val-323. SceФДГ – это единственная ФДГ, содержащая в данных положениях непролиновые аминокислоты. Согласно кристаллической структуре бактериального фермента, эти остатки находятся в неструктурированных участках.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. MacArthur M.W., Thornton J.M. // J. Mol. Biol. 1991. **218**. P. 397.
2. Watanabe K., Chishiro K., Kitamura K., Suzuki Y. // J. Biol. Chem. 1991. **266**. P. 24287.
3. Watanabe K., Masuda T., Ohashi H., Mihara H., Suzuki Y. // J. Biochem. 1991. **226**. P. 277.
4. Bogin O., Peretz M., Hacham Y. // Protein Sci. 1998. **7**. P. 1156.
5. Suzuki Y., Watanabe K. // J. Molec. Catal. B: Enzymatic 4. 1998. P. 167.
6. Cannio R., Rossi M., Bartolucci S. // J. Biochem. 1994. **222**. P. 345.
7. Delboni L.F., Mande S.C., Rentier-Delrue F. // Protein Sci. 1994. **4**. P. 2594.
8. Huang W., Petrosino J., Hirsch M. // J. Mol. Biol. 1996. **258**. P. 688.
9. McHarg J., Kelly S.M., Price N.C. // J. Biochem. 1999. **259**. P. 939.
10. Tagaya M., Yagami T., Noumi T. // J. Biol. Chem. 1989. **264**. P. 990.
11. Takagi H., Morinaga Y., Ikemura H. // J. Biochem. 1989. **105**. P. 953.
12. Tishkov V.I., Galkin A.G., Fedorchuk V.V., Savitsky P.A. // Biotechnol. Bioeng. 1998. **64**. P. 187.
13. Rojkova A.M., Galkin A.G., Kulakova L.B., Serov A.E. // FEBS Lett. 1999. **445**. P. 183.
14. Slusarczyk H., Felber S., Kula M.R., Pohl M. // J. Biochem. 2000. **267**. P. 1280.

15. *Tishkov V.I., Galkin A.G., Egorov A.M.* // *Biochemistry-Moscow*. 1989. **54**. P. 231.
16. *Ho S.N., Hunt H.D., Horton R.M., Pullen J.K., Pease L.R.* // *Gene*. 1989. **77**. P. 51.
17. *Tishkov V.I., Matorin A.D., Rojkova A.M.* // *FEBS Lett.* 1996. **390**. P. 104.
18. *Matthews B.W., Nicholson H., Becktel W.J.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1987. **84**. P. 6663.
19. *Matthews B.W.* // *Annu. Rev. Biochem.* 1993. **62**. P. 139.
20. *Herning T., Yutani K., Inaka K., Kuroki R.* // *Biochemistry*. 1992. **31**. P. 7077.
21. *Ueda T., Tamura T., Maeda Y., Hashimoto Y., Miki T., Yamada H.* // *Protein Eng.* 1993. **6**. P. 183.
22. *Masui A., Fujiwara N., Imanaka T.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 1994. **60**. P. 3579.
23. *Ishikawa K., Kimura S., Kanaya S., Morikawa K.* // *Protein Eng.* 1993. **6**. P. 85.
24. *Kimura S., Nakamura H., Hashimoto T., Oobatake M.* // *J. Biol. Chem.* 1992. **267**. P. 21535.
25. *Ohage E.C., Graml W., Walter M.M., Steinbacher S.* // *Protein Sci.* 1997. **6**. P. 233.
26. *Veltman O.R., Vriend G., Middelhoven P.J.* // *Protein Eng.* 1996. **9**. P. 1181.
27. *Lamzin V.S., Dauter Z., Popov V.O., Harutyunyan E.H.* // *J. Mol. Biol.* 1994. **236**. P. 759.

Поступила в редакцию 25.10.02