

УДК 577.15.02

NAD⁺-ЗАВИСИМЫЕ ФОРМИАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ИЗ *ARABIDOPSIS THALIANA* И СОИ: ЭКСПРЕССИЯ В КЛЕТКАХ *E. COLI* И КИНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА РЕКОМБИНАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ

Э.Г. Садыхов*, А.Е. Серов, И.Е. Ясный, Н.С. Войнова, А.А. Алексеева, А.С. Петров, В.И. Тишков

(кафедра химической энзимологии; e-mail: elchin@enz.chem.msu.ru)

Впервые осуществлена экспрессия в клетках *E. coli* NAD⁺-зависимых формиатдегидрогеназ (КФ 1.2.1.2, ФДГ) из *Arabidopsis thaliana* и сои *Glycine max* в виде активных и растворимых ферментов. Оба фермента были очищены до гомогенного состояния и изучены их кинетические свойства. Показано, что по сравнению с формиатдегидрогеназами из бактерий и дрожжей растительные ферменты имеют более низкие значения коэффициента Михаэлиса по формиату и NAD⁺. Сравнение кинетических свойств растительных формиатдегидрогеназ с NAD⁺ и NADP⁺ показало, что по своей коферментной специфичности эти ферменты близки к формиатдегидрогеназе из бактерий *Pseudomonas sp.101*.

Формиатдегидрогеназы (ФДГ, КФ 1.2.1.2) – это широко распространенные ферменты, катализирующие реакцию окисления формиат-иона до CO₂ при сопряженном восстановлении NAD⁺ в NADH. Эти ферменты представляют из себя в основном гомодимеры, состоящие из двух идентичных субъединиц, каждая из которых содержит по одному коферментсвязывающему и одному каталитическому домену [1]. NAD⁺-зависимые формиатдегидрогеназы были обнаружены во многих живых организмах. В высших растениях ФДГ локализована в митохондриальном матриксе, а также (как в *Arabidopsis thaliana*) в хлоропластах. Известно, что этот фермент участвует в окислении формиата в нефотосинтезирующих частях растений (ствол, корни). В результате стрессовых воздействий его содержание резко возрастает и в листьях [2]. ФДГ была выделена из разных штаммов бактерий, дрожжей и микроскопических грибов, а также из таких растений, как картофель, фасоль, горох, семена соевых бобов и *A. thaliana*. Подробный обзор о свойствах ФДГ из разных источников можно найти в работах [1, 2]. Первая кДНК-последовательность была изучена для ФДГ из картофеля, в настоящее время доступны последовательности для большого количества других растительных формиатдегидрогеназ (из ячменя, риса, ржи, яблони, дуба *A. thaliana*, сои *Glycine max* и др.) [2]. Кинетические свойства и специфичность к субстратам для ФДГ, выделенной из митохондрий *A. thaliana* были описаны в нескольких

публикациях [3–5]. Очистку этого фермента проводили с помощью хроматографии на DEAE-целлюлозе, *Sephadex G-200* и АМФ-агарозе [5].

В литературе нет данных по успешной экспрессии растительных ФДГ в клетках *E. coli*. Предпринятая попытка экспрессии ФДГ из картофеля *Solanum tuberosum* в клетках *E. coli* привела к образованию телец включения [6]. Данная работа посвящена экспрессии генов ФДГ из *A. thaliana* и сои *Glycine max* в клетках *E. coli* в активной и растворимой форме, а также выделению, очистке этих ферментов и исследованию их кинетических свойств.

Ì àòàðèàèÙ è ì àòì àù

ÀÙààèàíèà ìèàçì èàíìé ÀÍ È

Гены формиатдегидрогеназ из сои и *A. thaliana* были любезно предоставлены профессором Лабру из Сельскохозяйственного университета (г. Афины, Греция) и профессором Марквеллом из университета Северной Дакоты (США). Гены клонировали методом полимеразной цепной реакции, используя следующие пары олигонуклеотидов:

ñî ÿ

5'- agtccaagtccatcatggcgataaatgcctcaggtg-3'

5'- cacagaattctcaccgggtattggc-3'

A. thaliana

5'-gttacttcgctcatatgcagttaatcatcttc-3'

5'-tcctgaattcctaccggtactgag-3'

*Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН.

К праймерам (20 пкмоль каждого) добавляли 2,5 мкл 10-кратного буфера для ПЦР, поставляемого фирмой-производителем вместе с ферментом, 2 мкл раствора $MgCl_2$ (25 мМ), 2 мкл раствора dNTP (2,5 мМ каждого), 1 мкл раствора плазмидной ДНК (50 нг/мкл), 0,5 мкл *Pvu-Turbo* ДНК полимеразы (5 ед./мкл) и 17 мкл деионизованной воды до общего объема 25 мкл ПЦР проводили при следующих условиях: 25 циклов (1 мин при 94°C, 1 мин при 50°C и 2 мин при 72°C) с последующей 5 мин инкубацией при 72°C. Конечные продукты осаждали из реакционной смеси 70% этанолом в присутствии 0,7 М ацетата аммония и растворяли в деионизованной воде. Далее полученные фрагменты ДНК обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *EcoRI* и *NdeI* и очищали электрофоретически в 1% агарозном геле. Рестрикционные фрагменты лигировали с обработанным теми же эндонуклеазами рестрикции вектором pET21a. Лигазной смесью трансформировали клетки *E. coli* TG1. Выделенную после трансформации плазмидную ДНК картировали несколькими эндонуклеазами рестрикции и секвенировали на автоматическом ДНК-секвенаторе.

Трансформация и культивирование

Трансформацию клеток *E. coli* BL21(DE3) CodonPlus плазмидной ДНК проводили согласно методике, описанной Манниатисом и соавторами. Ночную культуру (4 мл) разбавляли в 100 раз в среде 2YT (16 г/л триптона, 10 г/л дрожжевого экстракта, 2,5 г/л двузамещенного фосфата калия, 1,5 г/л однозамещенного фосфата калия) и выращивали при аэрировании в течение 2–3 ч при 37°C. Затем культуральную жидкость центрифугировали в течение 2 мин при 5000 об/мин в центрифуге “Eppendorf 5403” при 4°C. Осадок клеток охлаждали до 0°C, ресуспендировали в 1 мл охлажденного до 0°C 50 мМ раствора $CaCl_2$ и после 30 мин инкубации во льду при 0°C снова центрифугировали в тех же условиях. Осадок клеток ресуспендировали в 100 мкл холодного 50 мМ раствора $CaCl_2$ и инкубировали 3–4 ч при 0°C. Для трансформации смешивали 100 мкл компетентных клеток и 1–10 мкл раствора плазмидной ДНК или реакционной смеси после мутагенеза или лигирования и инкубировали смесь в течение 60 мин при 0°C. Затем смесь клеток подвергали тепловому шоку при 42°C в течение 1–1,5 мин и охлаждали до 0°C во льду (1 мин). Далее в пробирку добавляли 1 мл среды 2YT, инкубировали трансформированные клетки при 37°C при легкой аэрации в течение 1 ч и высевали на чашки

Петри, с агаризованной средой (1,5%), содержащей ампициллин в концентрации 100 мкг/мл.

Наработку биомассы клеток *E. coli* с растительными ФДГ проводили в качалочных колбах объемом 100 мл и 1 л (рабочие объемы 25 и 200 мл среды соответственно), содержащих 2 или 4 отбойника. Клетки культивировали в среде 2YT при 30°C. В качестве индуктора биосинтеза ФДГ использовали моногидрат лактозы. Индуктор добавляли после достижения поглощения суспензии клеток при 600 нм (A_{600}) величины 0,6–0,8. Далее клетки культивировали еще 12–16 ч при 25°C. Среда для культивирования содержала 100 мкг/мл ампициллина и 25 мкг/мл хлорамфеникола. Клетки осаждали центрифугированием на центрифуге “Beckman J-21” (США) при 7500 об/мин в течение 20 мин при 4°C.

Очистка ферментов

Ферменты, экспрессированные в клетках *E. coli*, очищали согласно методике, разработанной для рекомбинатной ФДГ из *Pseudomonas sp.101* [7].

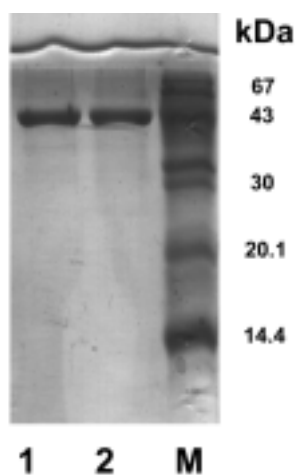
Процедура очистки фермента включала разрушение клеток (суспензия 1 г биомассы в 10 мл 0,1 М калий-фосфатного буфера, 0,02 М ЭДТА, pH 8,0) при 0°C на ультразвуковом дезинтеграторе “Braund-Sonic” (Германия), высаживание балластных белков сульфатом аммония (35% от насыщения), гидрофобную хроматографию на фенолсефарозе и гель-фильтрацию на колонке с Сефакрил S-200. Контроль чистоты осуществлялся с помощью аналитического электрофореза в 12% полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (аппаратура для электрофореза фирмы “BioRad”).

Измерение кинетических параметров

Активность и кинетические константы ФДГ определяли спектрофотометрически по накоплению NADH при длине волны 340 нм ($\epsilon_{340} = 6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) на спектрофотометре “Schimadzu UV 1601PC” при 30°C в 0,1 М калий-фосфатном буфере, pH 7,0. Измерение точной концентрации исходных растворов NAD^+ проводили при длине волны 260 нм ($\epsilon_{260} = 17800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Результаты и их обсуждение

Как было сказано выше, в литературе нет данных по успешной экспрессии растительных ФДГ в клетках *E. coli*. В результате нашей работы нам удалось экспрессировать в клетках *E. coli* в активной растворимой форме ФДГ как из *Arabidopsis thaliana*, так и из сои *Glycine max*. Более того, был достигнут



Аналитический электрофорез форматдегидрогеназ из сои *Glycine max* и *A. thaliana* (дорожки 1 и 2 соответственно); М – стандарты молекулярной массы белков

довольно высокий уровень экспрессии. В случае ФДГ из *A. thaliana* доля целевого фермента от общего количества растворимых белков *E. coli* составляла 20–25%, а для *Glycine max* – 7–10%. При завершении культивирования активность ферментов в культуральной жидкости составляла 1 и 5 ед/мл, а поглощение клеток на 600 нм – (10–12) и (18–22) для ФДГ из *Glycine max* и *A. thaliana* соответственно. В случае ФДГ *A. thaliana* выход фермента составил почти 1 г фермента с 1 л среды. После выделения чистота образцов ферментов составляла не менее 95% по данным аналитического электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия (рисунок).

Были исследованы кинетические свойства полученных ФДГ. В табл. 1 приведены кинетические

параметры ФДГ из *A. thaliana*, экспрессированной в клетках *E. coli*, а также литературные данные для этого фермента, выделенного разными методами как из природных, так и из трансгенных растений. Из табл. 1 видно, что в зависимости от метода выделения можно получить препараты ФДГ двух типов – с высокими и низкими значениями константы Михаэлиса (K_M). Форму с низкими значениями K_M можно получить путем термообработки (60°C, 5 мин) формы с высокими значениями K_M , однако при этом происходит значительное падение активности фермента. По-видимому, фермент может существовать в двух конформациях. Данные наших экспериментов показывают, что в клетках *E. coli* ФДГ синтезируется в конформации, обеспечивающей низкие значения K_M . Достоинством экспрессии ФДГ из *A. thaliana* в *E. coli* является более высокая удельная активность (как минимум в 3 раза), чем у фермента, выделенного из трансгенной *A. thaliana*.

В табл. 2 приведены кинетические параметры выделенных нами растительных ферментов в сравнении с ФДГ из *Pseudomonas sp.101*. Из этой таблицы видно, что сродство к обоим субстратам при переходе от бактериального фермента к растительным значительно повышается, однако при этом следует отметить снижение удельной активности у растительных форматдегидрогеназ. Тем не менее снижение в 3 раза величины константы Михаэлиса по NAD^+ делает эти ферменты очень перспективными для практического применения, поскольку в случае их использования возможно снижение в 3 раза концентрации NAD^+ .

Таблица 1

Сравнение кинетических свойств различных препаратов форматдегидрогеназы из *A. thaliana* в зависимости от источника и способа получения

Источник ФДГ	Удельная активность, ед/мг	K_m формат, мМ	$K_m NAD^+$, мМ
<i>A. thaliana</i> Li et al, 2000 [3]	1910	1,4	34
<i>A. thaliana</i> Olson et al, 2000 [4]	453	10,0	65
<i>A. thaliana</i> очистка хроматографией D E–52 [5]	43	12,0	75
<i>A. thaliana</i> фракция DE-52 после прогрева [5]	94	3,3	35
<i>A. thaliana</i> экспрессированная в табаке [5]	1256	11,0	78
<i>A. thaliana</i> экспрессированная в <i>E. coli</i> *	6500	2,8	20

*Данные этой работы.

Таблица 2

Кинетические свойства форматдегидрогеназ из бактерий *Pseudomonas sp.101* и растений *A. thaliana* и сои *Glycine max*

Источник ФДГ	Удельная активность, Ед/мг	$K_m^{NAD^+}$, μM	$K_m^{NADP^+}$, мМ	$K_m^{формат}$, мМ	$\frac{k_{cat}^{NADP^+}}{K_m^{NADP^+}} / \frac{k_{cat}^{NAD^+}}{K_m^{NAD^+}}$
<i>Pseudomonas sp.101</i>	10.0±0.7	60±5	>200	7.0±0.8	4.2×10^{-4}
<i>Arabidopsis thaliana</i>	6.5±0.5	20±0.8	10±2	2.8±0.3	5.0×10^{-5}
<i>Glycine max</i>	6.2±0.4	17.4±1.6	1.00±0.05	1.2±0.1	8.7×10^{-4}

Сравнение кинетических свойств обеих растительных форматдегидрогеназ с NAD^+ и $NADP^+$ (табл. 2) свидетельствует, что по своей коферментной специфичности (последняя колонка в табл. 2) растительные ферменты очень близки к форматдегидрогеназе из бактерий *Pseudomonas sp.101* и сильно отличаются от ферментов из дрожжей, которые взаимодействуют с NAD^+ в сотни тысяч и миллионы раз более эффективно по сравнению с $NADP^+$ [7, 8]

Таким образом, нам впервые удалось осуществить экспрессию в клетках *E. coli* генов растительных форматдегидрогеназ в активной и растворимой форме. Экспрессия этих форматдегидрогеназ в клетках *E. coli* является самым эффективным способом получения высокоактивного фермента. В дальнейшем мы планируем детальное изучение физико-химических свойств этих форматдегидрогеназ, таких как термостабильность, рН-зависимость кинетических параметров, изменение коферментной специфичности и т.д.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект РФФИ а-05-04-49073) и Федерального агентства по науке и инновациям (контракт № 02.435.11.3005).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Popov V.O., Lamzin V.S. // Biochem. J. 1994. **301**. P. 625.
2. Тишков В.И., Попов В.О. // Биохимия. 2004. **69**. С.1537
3. Li R., Ziola B., King J. // J. Plant Physiol 2000. **157**. P. 161
4. Olson B., Skavdahl M., Ramberg H., Osterman J.C., Markwell J. // Plant Sci. 2000. **159**. P. 205.
5. Baack R.D., Markwell J., Herman P.L., Osterman J.C. // J. Plant Physiol. 2003. **160**. P. 445.
6. Ambard-Bretteville F., Sorin C., Rébeillé F., Hourton-Cabassa C., Colas des Francs-Small C. // Plant Molecular Biology. 2003. **52**. P. 1153.
7. Tishkov V.I., Matorin A.D., Rojkova A.M., Fedorchuk V.V., Savitsky P.A., Dementieva L.A., Lamzin V.S., Mezentzev A.V., Popov V.O. // FEBS Lett. 1996. **390**. P. 104.
8. Serov A.E., Popova A.S., Fedorchuk V.V., Tishkov V.I. // Biochem. J. 2002. **367**. P. 841.

Поступила в редакцию 01.12.05

NAD⁺-DEPENDENT FORMATE DEHYDROGENASE FROM *ARABIDOPSIS THALIANA* AND SOYA: EXPRESSION IN *E. COLI* CELLS AND KINETIC PROPERTIES OF RECOMBINANT ENZYMES

E.G. Sadykhov, A.E. Serov, I.E. Yasny, N.S. Voinova, A.A. Alekseeva, A.S. Petrov, V.I. Tishkov

(Division of Chemical Enzymology)

It is the first case of successful expression in *E.coli* cells of NAD^+ -dependent formate dehydrogenases (EC 1.2.1.2) from plants *Arabidopsis thaliana* and soya *Glycine max* as active and soluble enzymes. Both enzymes were obtained in homogeneous form and kinetic properties of recombinant enzymes were studied. It was shown that new formate dehydrogenases have lower K_m values for coenzyme NAD^+ and second substrate formate compared to ones for the enzymes from bacteria and yeasts. Comparison of kinetic properties of plant formate dehydrogenases with NAD^+ and $NADP^+$ has shown that its coenzyme specificity is similar to one for the from bacterium from *Pseudomonas sp.101*.