

УДК 577.15.02

ФОРМИАТДЕГИДРОГЕНАЗА ПЕКАРСКИХ ДРОЖЖЕЙ: НЕОБЫЧНЫЙ МЕХАНИЗМ ТЕРМОИНАКТИВАЦИИ И СТАБИЛИЗАЦИЯ ИОННОЙ СИЛОЙ И КОФАКТОРОМ

А.Е. Серов, В.И. Тишков

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

Формиатдегидрогеназа пекарских дрожжей (SceФДГ) имеет уникальный для NAD^+ -зависимых ФДГ механизм термоинактивации. Процесс включает в себя две стадии, первая из которых обратима, тогда как тепловая денатурация остальных ФДГ протекает в соответствии с кинетикой необратимой реакции первого порядка. Необычный механизм инактивации и низкая термостабильность SceФДГ, по всей видимости, связаны с повышенной гибкостью полипептидной цепи этого фермента. В присутствии кофактора и высоких концентраций солей наблюдается чрезвычайно сильная стабилизация SceФДГ.

NAD^+ -зависимая формиатдегидрогеназа (ФДГ; КФ 1.2.1.2) – фермент, наиболее подходящий для регенерации восстановленного кофактора в биотехнологических процессах синтеза оптически активных соединений [1]. ФДГ состоит из двух идентичных субъединиц с молекулярной массой 40–44 кДа, каждая из которых имеет независимый активный центр [2]. Гены ФДГ обнаружены в различных прокариотических и эукариотических источниках: в метилотрофных бактериях [3–5] и дрожжах [6–8], пекарских дрожжах [9], низших грибах [10, 11] и высших растениях [12–15]. ФДГ является высококонсервативным белком. При сравнении ферментов бактерий *Pseudomonas* sp.101, дрожжей *H. polymorpha* и митохондрий картофеля наблюдается 40–50%-й уровень полной гомологии. Все аминокислотные остатки, имеющие значение для катализа и связывания субстрата и кофермента, строго консервативны.

Особенности первичной структуры ФДГ из *S. cerevisiae* (SceФДГ) позволяют выделить этот фермент среди остальных ФДГ. SceФДГ характеризуется повышенной гибкостью полипептидной цепи, в том числе и в районе активного центра. Ряд консервативных остатков пролина в SceФДГ заменен на другие аминокислоты. Так, ФДГ из бактерий *Pseudomonas* sp.101 (PseФДГ) содержит 24 остатка пролина, ФДГ из дрожжей *Candida boidinii* (CboФДГ) и *Candida methylica* (CmeФДГ) – по 14 остатков пролина, а SceФДГ – всего 12.

На основе анализа первичной структуры SceФДГ можно сделать предположение, что данный фермент обладает необычным для формиатдегидрогеназ поведением при тепловой денатурации. Цель данной работы – изучение механизма термоинактивации

SceФДГ и поиск путей стабилизации этого белка. Ранее ген SceФДГ был клонирован и экспрессирован в клетках *E. coli* в активной растворимой форме.

Методы исследования

В кинетических экспериментах использовали NAD^+ (99% чистоты, “Sigma”), формиат натрия и сульфат аммония марки “analytical grade” (“Merck”).

Рекомбинантную ФДГ пекарских дрожжей дикого типа, экспрессированную в клетках *E. coli*, выделяли и очищали по стандартной методике, разработанной для бактериальной ФДГ [16]. Полученные препараты фермента имели чистоту не менее 95% согласно данным аналитического электрофореза в 12%-м полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия. Активность ФДГ определяли спектрофотометрически по накоплению НАН при длине волны 340 нм ($\epsilon_{340} = 6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) на спектрофотометре “Schimadzu UV 1601PC” при 25°C 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 ФДГ измеряли в 0,1 М калий-фосфатном буфере (рН 7,0). Для каждой формы ФДГ готовили серию пластиковых пробирок объемом 1,5 мл, содержащих по 100 мкл раствора фермента (0,2 мг/мл). Пробирки помещали в предварительно прогретый до необходимой температуры водный термостат (точность термостатирования $\pm 0,1^\circ\text{C}$). В моменты отбора проб пробирки с ферментными препаратами переносили в лед на 5 мин. Для реактивации препаратов ФДГ пробирки помещали на 200 мин в прогретый до 30°C водный термостат. Остаточную активность ФДГ измеряли, как описано выше. Кине-

тику реактивации изучали при комнатной температуре (22°C).

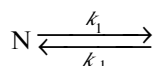
Анализ кинетических данных проводили в программе Sigma plot 2000.

Результаты экспериментов

Бактериальные ФДГ более устойчивы к тепловой денатурации, чем их аналоги из метилотрофных дрожжей. При 57°C период полуинактивации ($t_{1/2}$) рекомбинантной ФДГ из метилотрофных дрожжей *S. boidinii* (СбоФДГ) составляет 20 мин [17], а фермент из бактерий *Pseudomonas* sp.101 (PseФДГ) остается стабильным в течение нескольких дней [18]. Мы обнаружили, что ФДГ пекарских дрожжей (SceФДГ) обладает необычно низкой термостабильностью даже по сравнению с другими дрожжевыми ФДГ. Инкубация препаратов фермента в течение 20 мин при 45°C приводит к полной потере активности.

Теоретически возможны несколько различных механизмов инактивации SceФДГ. Потеря активности бактериальной ФДГ при 4–37°C связана с окислением сульфгидрильных групп [19]. Процесс протекает в несколько стадий, и кривая инактивации имеет S-образную форму. При температуре выше 50°C инактивация PseФДГ обусловлена термоденатурацией и описывается кинетикой реакции первого порядка [18, 19]. Инактивация ФДГ из метилотрофных дрожжей протекает по механизму тепловой денатурации как при низких, так и при высоких температурах [17, 20, 21]. Кривые инактивации этих ферментов также представляют собой простые экспоненты.

В связи с низкой термостабильностью SceФДГ кинетику инактивации фермента пекарских дрожжей изучали в диапазоне температур 37–50°C. Оказалось, что при 37°C SceФДГ теряет лишь около 50% активности. Это позволяет предположить, что процесс является обратимым:



Зависимость остаточной активности от времени описывается уравнением:

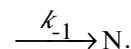
$$[N] = [N]_0 - ([N]_0 - [N]_{\infty}) \times (1 - e^{-(k_{-1} + k_1)t}).$$

Отношение констант для прямой и обратной стадий может быть рассчитано по уравнению

$$\frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{[N]_0 - [N]_{\infty}}{[N]_{\infty}},$$

где $[N]_0$ – концентрация активного фермента, $[N]_{\infty}$ – концентрация активного фермента после достижения равновесия. Экспериментальные данные линейризуются в координатах $\ln([N] - [N]_{\infty}) - t$ (рис. 1).

Последующая инкубация препаратов фермента при 20–30°C приводит к восстановлению активности до исходного уровня. Реактивация при 22°C представляет собой необратимую реакцию первого порядка:



Эту кинетическую схему описывает уравнение:

$$[N] = [N]_0 + ([N]_{\max} - [N]_0) \times (1 - e^{-k_{-1}t}),$$

где $[N]_0$ – исходная концентрация активного фермента после денатурации при 37°C, $[N]_{\max}$ – концентрация активного фермента после завершения процесса реактивации. Зависимость активности от времени представляет собой прямую в координатах $\ln([N]_{\max} - [N]) - t$ (рис. 1).

При 45°C полной реактивации SceФДГ не наблюдается, что указывает на наличие при этой температуре второй (необратимой) стадии инактивации белка. Зависимость суммарной концентрации активной SceФДГ и промежуточного продукта, выраженной в единицах активности, от времени инактивации при 45°C можно получить, измерив остаточную активность SceФДГ после реактивации препаратов фермента при 30°C (рис. 2). Если из данной кривой вычесть кривую инактивации, можно получить кинетическую кривую для промежуточного продукта.

Таким образом, термоинактивация SceФДГ протекает в две стадии, первая из которых обратима. Это означает, что ФДГ пекарских дрожжей принципиально отличается от всех известных на сегодняшний день формиатдегидрогеназ по механизму тепловой денатурации.

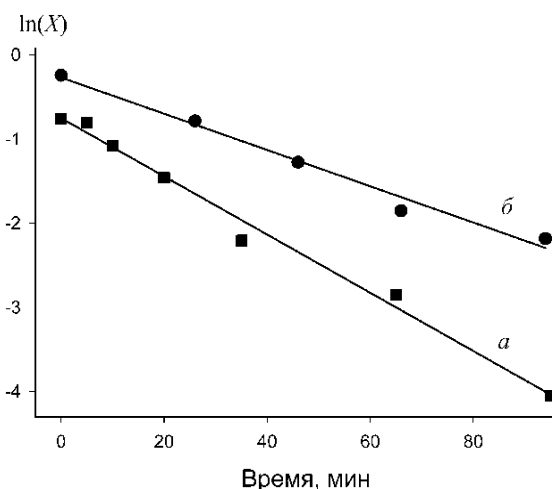


Рис. 1. Инактивация SceФДГ при 37°C (а) и реактивация при 22°C (б) в координатах $\ln(X) - t$; для 37°C $X = [N] - [N]_{\infty}$; для 22°C $X = [N]_{\max} - [N]$; 0,1 М калий-фосфатный буфер (рН 7,0)

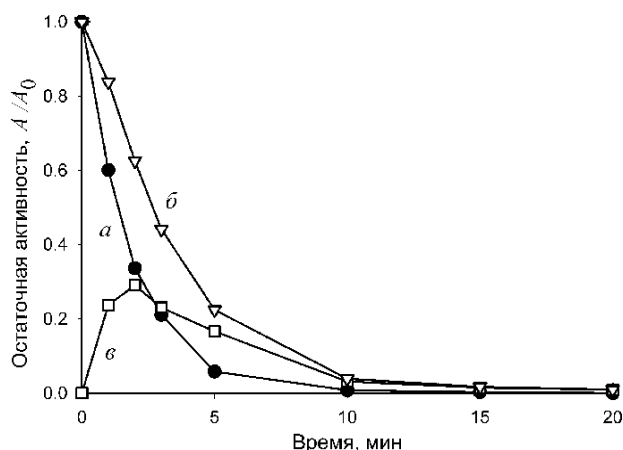


Рис. 2. Зависимость остаточной активности SceФДГ от времени: инактивация при 45°C (а); при 45°C с реактивацией при 30°C (б); *v* – разность между *б* и *а* (0,1 М калий-фосфатный буфер, pH 7,0)

Ионная сила оказывает очень большое влияние на термостабильность SceФДГ. Из литературы известно, что растворы солей стабилизируют другие бактериальные и дрожжевые ФДГ: PseФДГ [22], SmeФДГ [20] и SboФДГ [17, 21]. Так, для нативной SmeФДГ в присутствии 0,3 М формиата или ацетата натрия значение $t_{1/2}$ увеличивается в несколько раз при разных температурах. Влияние ионной силы на термостабильность SceФДГ оказалось гораздо выше. Первоначально эффект наблюдали при очистке дрожжевого фермента. Первая стадия очистки SceФДГ представляла собой осаждение балластных белков сульфатом аммония. Оказалось, что добавление 1 М сульфата аммония к препаратам белка, полученным из бесклеточного экстракта, повышает значение $t_{1/2}$ при 51°C с экспериментально не различимой величины до 20 мин. В присутствии 2 М сульфата аммония для очищенной SceФДГ были получены кривые инактивации в диапазоне температур 53–57°C (рис. 3). Периоды полуинактивации фермента при 55 и 57°C составляют соответственно 90 и 5 мин. 2 М сульфат аммония стабилизирует SceФДГ на 15°C – до уровня аналогов этого фермента, выделенных из метилотрофных дрожжей. Аналогичная стабилизация наблюдалась и в присутствии формиата натрия (данные не показаны), т.е. эффект не является специфическим.

Ферментативная реакция с участием SceФДГ протекает согласно двухсубстратной упорядоченной схеме, где NA^+ является первым связываемым субстратом [23]. Связывание кофактора приводит к дополнительной стабилизации SceФДГ. Действительно, в присутствии 10 мМ NA^+ значение $t_{1/2}$ для SceФДГ

при 42,5°C увеличивается в 36 раз и составляет около 90 мин. Благодаря специфической стабилизации кофактором и неспецифической стабилизации ионной силой, зависимость активности SceФДГ от температуры представляет собой экспоненту в диапазоне температур 10–50°C (рис. 4).

Обсуждение результатов

Одной из основных причин низкой термостабильности ФДГ пекарских дрожжей может быть повышенная гибкость полипептидной цепи, благодаря чему нативная конформация этого белка является более “релаксированной”. На это указывает достаточно легкий взаимный переход нативной и обратимо денатурированной форм SceФДГ при 30–40°C. Наблюдаемая стабилизация фермента кофактором и

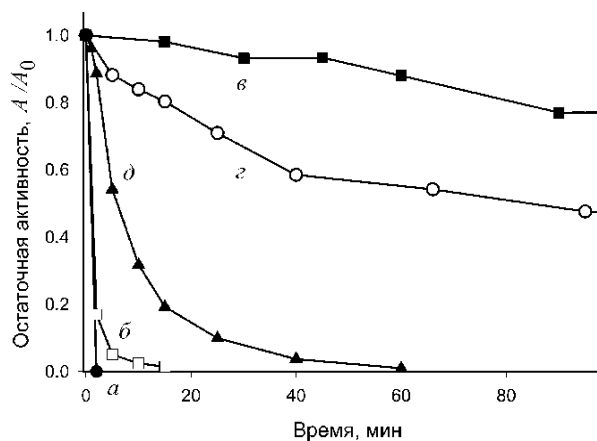


Рис. 3. Зависимость остаточной активности SceФДГ от времени: инактивация SceФДГ при 50°C (а) и при 50°C с реактивацией при 30°C (б); инактивация в присутствии 2 М сульфата аммония при температуре, °C: *v* – 53, *z* – 55, *d* – 58 (0,1 М калий-фосфатный буфер, pH 7,0)

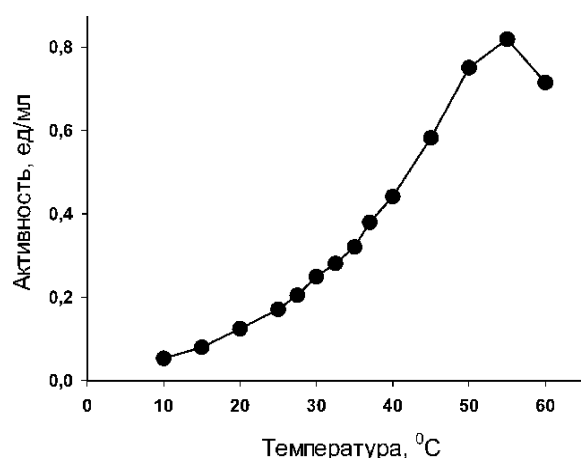


Рис. 4. Температурная зависимость активности SceФДГ (0,1 М калий-фосфатный буфер, pH 7,0)

ионной силой также подтверждает данный вывод. Образование комплекса фермент–кофактор фиксирует активную конформацию белка, за счет чего наблюдается повышение устойчивости SceФДГ к тепловой денатурации. Аналогичные примеры можно найти в литературе. Например, связывание NAD^+ в районе контакта двух димеров глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы человека стабилизирует тетрамерную молекулу этого фермента [24]. Повышение ионной силы приводит к увеличению гидрофобных взаимодействий в SceФДГ и снижает подвижность белковой глобулы. Для дальнейшей стабилизации ФДГ пекарских дрожжей большой интерес представляют методы белковой инженерии. Мы предполагаем, что введение в белковую глобулу остатков пролина по-

зволит дополнительно повысить жесткость полипептидной цепи SceФДГ.

Функция ФДГ в клетках пекарских дрожжей до сих пор неизвестна. В метилотрофных организмах ФДГ играют ключевую роль в метаболизме, катализируя финальный шаг катаболизма C1-соединений [2]. Поскольку пекарские дрожжи не содержат алкогольоксидазы, они не могут использовать в качестве питательного субстрата метанол [25]. Однако пекарские дрожжи имеют возможность для утилизации формальдегида до углекислого газа [9]. Вероятно, отличия в стабильности и механизмах термоинактивации ФДГ из метилотрофов и пекарских дрожжей обусловлены особыми биохимическими функциями SceФДГ в клетке *S. cerevisiae*.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект РФФИ а-05-04-49073).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Seelbach K., Riebel B., Hummel W., Kula M.R., Tishkov V.I., Egorov A.M., Wandrey C., Kragl U. // Tetrahedron Lett. 1996. **37**. P. 1377.
2. Popov V.O., Lamzin V.S. // Biochem. J. 1994. **301**. P. 625.
3. Tishkov V.I., Galkin A.G., Marchenko G.N., Tsygankov Y.D., Egorov A.M. // Biotechnol. Appl. Biochem. 1993. **18**. P. 201.
4. Galkin A., Kulakova L., Tishkov V., Esaki N., Soda K. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1995. **44**. P. 479.
5. Beja O., Aravind L., Koonin E.V. et al. // Science. 2000. **289**. P. 1902.
6. Allen S.J., Holbrook J.J. // Gene. 1995. **162**. P. 99.
7. Sakai Y., Murdanoto A.P., Konishi T., Iwamatsu A., Kato N. // J. Bacteriol. 1997. **179**. P. 4480.
8. Hollenberg C.P., Janowicz Z. // European Patent Application. 1989.
9. van den Berg M.A., Steensma H.Y. // Yeast. 1997. **13**. P. 551.
10. Chow C.M., Raj Bhandary U.L. // J. Bacteriol. 1993. **175**. P. 3703.
11. Saleeba J.A., Cobbett C.S., Hynes M.J. // Mol. Gen. Genet. 1992. **235**. P. 349.
12. Olson B.J.S.C., Skavdahl M., Ramberg H., Osterman J.C., Markwell J. // Plant Sci. 2000. **159**. P. 205.
13. Colas d.F.-S., Ambard-Bretteville F., Small I.D., Remy R. // Plant Physiol. 1993. **102**. P. 1171.
14. Shiraishi T., Fukusaki E., Kobayashi A. // J. Biosci. Bioeng. 2000. **89**. P. 241.
15. Suzuki K., Itai R., Suzuki K. et al // Plant Physiol. 1998. **116**. P. 725.
16. Tishkov V.I., Matorin A.D., Rojkova A.M. et al. // FEBS Lett. 1996. **390**. P. 104.
17. Slusarczyk H., Felber S., Kula M.R., Pohl M. // Eur. J. Biochem. 2000. **267**. P. 1280.
18. Rojkova A.M., Galkin A.G., Kulakova L.B. et al. // FEBS Lett. 1999. **445**. P. 183.
19. Диков М.М., Карулин А., Осипов А.П., Егоров А.М. // Биоорганическая химия. 1979. **5(8)**. С. 1217.
20. Avilova T.V., Egorova O.A., Ioanesyan L.S., Egorov, A.M. // Eur. J. Biochem. 1985. **152**. P. 657.
21. Тишков В.И., Галкин А.Г., Егоров А.М. // Биохимия. 1989. **54**. С. 299.
22. Тишков В.И., Попов В.О. // Биохимия. 2004. **69**. С. 1537
23. Серов А.Е., Попова А.С., Тишков В.И. // Докл. АН. 2002. **382**. С. 401.
24. Au S.W., Gover S., Lam V.M., Adams M.J. // Structure Fold. Des. 2000. **8**. P. 293.
25. Distel B., Veenhuis M., Tabak H.F. // EMBO J. 1987. **6**. P. 3111.

Поступила в редакцию 01.12.05

BAKING YEAST FORMATE DEHYDROGENASE: UNUSUAL MECHANISM OF THERMAL INACTIVATION AND STABILIZATION BY IONIC STRENGTH AND COFACTOR

A.E. Serov, V. I. Tishkov

(Division of Chemical Enzymology)

Mechanism of thermal inactivation of baker's yeast formate dehydrogenase (SceFDH) is unique for the family of NAD^+ -dependent FDHs. The enzyme inactivates in two stages with the first one being reversible, while the denaturation of other FDHs is described by non-reversible first-order kinetics. Unusual mechanism of inactivation and low thermal stability of SceFDH are most probably connected with the flexibility of its polypeptide chain. SceFDH is observed to be highly stabilized by ionic strength and cofactor.