

УДК 577.15.02

## ИНАКТИВАЦИЯ ФОРМИАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ПРИ pH 8

Н.С. Войнова, С.С. Савин\*, А.А. Алексеева, О.Е. Скиргелло, В.И. Тишков

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

**Исследована зависимость константы первого порядка скорости инактивации рекомбинантных формиатдегидрогеназ из растений *Arabidopsis thaliana* и сои, а также мутантной формиатдегидрогеназы из бактерий *Pseudomonas* sp.101 (PseФДГ GAV) от концентрации фосфатного буфера. Показано, что в зависимости от ионной силы может наблюдаться как стабилизация, так и дестабилизация фермента.**

Пристальное внимание исследователей во всем мире привлекает  $\text{NAD}^+$ -зависимая формиатдегидрогеназа (КФ 1.2.1.2., ФДГ) из различных источников. В бактериях при росте на метаноле этот фермент участвует в обеспечении клетки энергией, катализируя последнюю стадию окисления вышеуказанного соединения до углекислого газа с помощью полиферментной системы (метанолдегидрогеназа – формальдегиддегидрогеназа – ФДГ). В растениях формиатдегидрогеназа локализована в митохондриях и является одним из важнейших ферментов, синтезируемых при стрессовых воздействиях [1]. Научный интерес к ФДГ связан с тем, что он является модельным ферментом для изучения механизма действия D-специфичных  $\text{NAD(P)}^+$ -зависимых дегидрогеназ 2-гидроксикислот [2].

Формиатдегидрогеназа имеет также и большое практическое значение, так как широко используется в биокаталитических процессах синтеза оптически активных соединений с помощью дегидрогеназ [3]. Эффективность использования ФДГ в этих процессах связана с широким pH-оптимумом активности, необратимостью катализируемой реакции, дешевизной второго субстрата – формиата, простотой удаления продукта реакции бикарбонат-иона при очистке целевого продукта. Для эффективного применения фермента необходимо иметь подробную информацию о его стабильности при разных условиях – температуре, pH-среде и ионной силе раствора. К сожалению, такие данные в литературе, как правило, приводятся лишь для одного значения pH и концентрации буфера. Имеется лишь одна работа, в которой термостабильность рекомбинантных ФДГ из бактерий *Pseudomonas* sp.101 (Pse ФДГ) и *Mycobacterium vaccae* N10 была

изучена в широком диапазоне концентраций фосфатного буфера при pH 7,0 [4]. В данной работе мы изучили зависимость константы скорости первого порядка термоинактивации трех рекомбинантных формиатдегидрогеназ – из растений *Arabidopsis thaliana* (AraФДГ) и сои (SoyФДГ) и мутантного фермента PseФДГ GAV. Выбор этих ферментов связан с тем, что рекомбинантные растительные ФДГ, экспрессированные в клетках *E. coli*, являются практически неизученными ферментами, а PseФДГ GAV в настоящее время наиболее широко используется на практике.

### Экспериментальная часть

Растительные формиатдегидрогеназы и PseФДГ GAV получали, как описано ранее [3, 5]. Согласно данным аналитического электрофореза, чистота полученных препаратов в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия составляла не менее 98%. Ферменты хранили в 0,1 М фосфатном буфере, pH 7,0 в присутствии 20 мМ ЭДТА. Для исследования термостабильности при pH 8,0 и разных концентрациях в день проведения экспериментов брали по 1 мл (2 порции) каждого фермента (активность 10–20 Ед/мл) и с помощью гель-фильтрации через *Сефадекс G-10 Superfine* (колонка 1 × 10 см) переводили одну порцию в 0,05 М фосфатный буфер (pH 8,0), а вторую – в 1,5 М фосфатный буфер (pH 8,0); pH буферов контролировали с точностью до 0,01 ед. pH на pH-метре фирмы “Эконикс Эксперт” (Россия) при той температуре, при которой проводили эксперименты по исследованию термостабильности.

Активность формиатдегидрогеназы определяли на спектрофотометре “UV-1601PC” (“Shimadzu”) при

30°C по поглощению NADH на длине волны 340 нм ( $\epsilon_{340} = 6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

Измерение активности проводили в 0,1 М натрий-фосфатном буфере (рН 7,0) и концентрациях формиата натрия и  $\text{NAD}^+$  0,3 М и 1,2 мг/мл соответственно. Точные концентрации исходных растворов  $\text{NAD}^+$  определяли спектрофотометрически на длине волны 260 нм ( $\epsilon_{260} = 18000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Точную концентрацию формиата натрия определяли в тех же условиях, что и активность ФДГ, по конечной концентрации NADH в условиях избытка  $\text{NAD}^+$ .

Для получения препаратов ФДГ в фосфатном буфере с рН 8,0 и требуемой концентрацией ( $c$ ) препараты фермента в 0,01 и 1,5 М фосфатных буферах смешивали в определенной пропорции, при необходимости добавляли фосфатный буфер нужной концентрации так, чтобы активность фермента составляла 2–3 ед. активности на мл раствора.

Для исследования кинетики термоинактивации готовили серию из пластиковых пробирок объемом 1,5 мл, содержащих по 50 мкл раствора фермента (0,2 мг/мл) в требуемом фосфатном буфере. Пробирки помещали в предварительно прогретый до необходимой температуры водный термостат (56–62°C, точность термостатирования  $\pm 0,1^\circ\text{C}$ ). В определенные моменты времени отбирали по одной пробирке и переносили в лед на 3 мин, после чего для удаления образующегося осадка фермента пробирку центрифугировали в течение 3 мин при 12000 об/мин на центрифуге “Эппендорф 5415D”. Остаточную активность ФДГ измеряли, как описано выше. Константу скорости термоинактивации  $k_i$  определяли как тангенс угла наклона прямой графика зависимости натурального логарифма величины остаточной активности от времени (полулогарифмические координаты  $\ln(A/A_0) - t$ ) методом линейной регрессии, используя программу «Origin 7.0».

### Результаты и их обсуждение

При температурах выше 45°C в большинстве случаев основной причиной инактивации ферментов является разворачивание белковой глобулы (термоденатурация). Скорость и глубина протекания этого процесса зависит от различных параметров – температуры, рН среды, наличия субстратов и ингибиторов. Степень влияния того или иного параметра определяется тем, на какие взаимодействия в молекуле белка он влияет, а также ролью этих взаимодействий в стабилизации белковой глобулы. Как известно, при сборке молекулы глобулярных белков под действием энтропийного

фактора происходит упаковка гидрофобных аминокислотных остатков внутри белковой глобулы. В результате обеспечивается эффективная стабилизация ядра глобулы за счет гидрофобных взаимодействий. Однако кроме гидрофобных существенное влияние на стабильность белковой глобулы могут оказывать и другие взаимодействия, например электростатические. Среди нековалентных взаимодействий они являются одними из самых сильных. В разных белках эти два типа взаимодействий вносят различный вклад в стабилизацию их структуры. Более того, их соотношение может зависеть от концентрации буферного раствора. При увеличении концентрации буфера возрастает ионная сила и электростатические взаимодействия в белковой глобуле должны ослабляться. В то же время увеличение ионной силы обеспечивает усиление гидрофобных взаимодействий. Для выяснения роли гидрофобных и электростатических взаимодействий в термостабильности формиатдегидрогеназ мы решили использовать фосфатный буфер. Фосфат-ион имеет достаточно большие размеры. Он не ингибирует ферментативную активность и согласно данным рентгеноструктурного анализа не проникает внутрь глобулы ФДГ. Таким образом, изменяя концентрацию фосфатного буфера, можно влиять на электростатические взаимодействия на поверхности молекулы фермента, не затрагивая при этом саму структуру белковой глобулы.

Кинетика инактивации всех трех формиатдегидрогеназ – из растений *Arabidopsis thaliana* (AraФДГ) и сои (Soy ФДГ) и мутантной бактериальной ФДГ из *Pseudomonas* sp.101 PseФДГ GAV – была исследована при рН 8,0 в широком диапазоне температур. Было показано, что во всех случаях независимо от концентрации фосфатного буфера потеря активности описывалась простой экспонентой и не зависела от концентрации фермента. Это свидетельствует о том, что термоденатурации всех трех ФДГ являются мономолекулярным процессом и значение константы первого порядка скорости инактивации является величиной, напрямую характеризующей термостабильность белковой глобулы в данных условиях. В качестве примера на рис. 1 приведены зависимости остаточной активности от времени для AraФДГ.

Поскольку исследуемые формиатдегидрогеназы отличаются по своей термостабильности (это касается SoyФДГ, стабильность которой как минимум в 1000 ниже, чем AraФДГ и особенно PseФДГ GAV), то зависимость константы скорости термоинактивации от концентрации фосфатного буфера исследовали при разных температурах – для SoyФДГ – при 52°C,

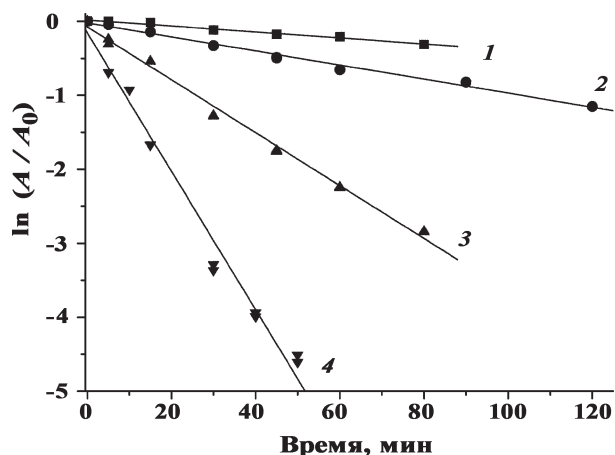


Рис. 1. Инактивация формиатдегидрогеназы из растений *Arabidopsis thaliana* в 0,1 М фосфатном буфере (рН 8,0) при разных температурах, °С: 1 – 56, 2 – 58, 3 – 60, 4 – 62

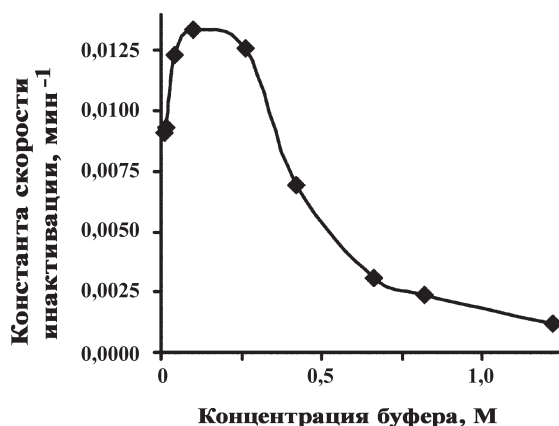


Рис. 3. Зависимость величины константы скорости инактивации рекомбинантной формиатдегидрогеназы из растений *Arabidopsis thaliana* от концентрации фосфатного буфера (рН 8,0; 58°С)

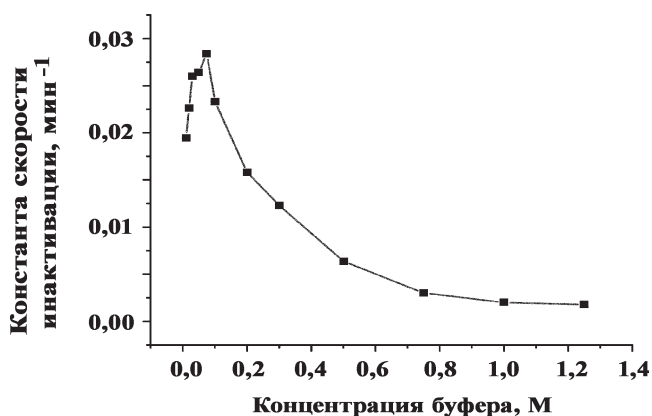


Рис. 2. Зависимость величины константы скорости инактивации рекомбинантной формиатдегидрогеназы из сои от концентрации фосфатного буфера (рН 8,0; 52°С)

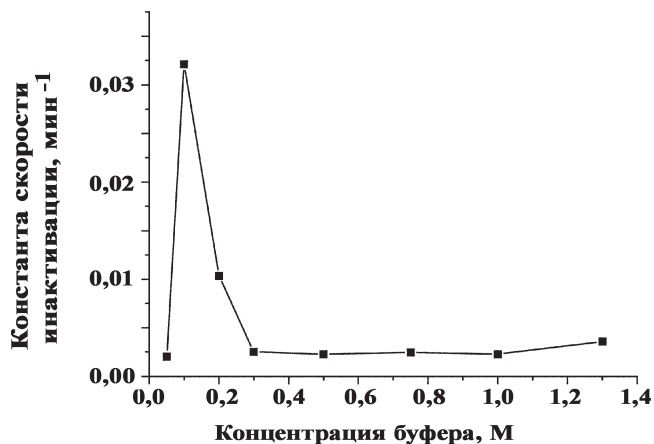


Рис. 4. Зависимость величины константы скорости инактивации мутантной формиатдегидрогеназы PseФДГ GAV от концентрации фосфатного буфера (рН 8,0; 63 °С)

для АгаФДГ – при 58°С и для PseФДГ GAV – при 63°С. Полученные результаты представлены на рис. 2–4. Из этих рисунков видно, что зависимости константы скорости инактивации сильно отличаются друг от друга как по общей форме кривой, так и по величине. В случае ферментов из растений электростатические взаимодействия играют не самую главную роль в стабильности белковой глобулы – при повышении концентрации фосфатного буфера до 0,1 М константа скорости инактивации увеличивается не более, чем в 1,4–1,5 раза, в то же время при дальнейшем увеличении концентрации фосфата за счет усиления гидрофобных взаимодействий наблюдается стабилизация фермента в 10

раз. В случае АгаФДГ (рис. 3) диапазон концентраций буфера, в котором стабильность фермента наименьшая, более широкий, чем в случае SoyФДГ (рис. 2). Наименее узкий “диапазон нестабильности” наблюдается для мутантной PseФДГ GAV. Фактически стабильность этого фермента не зависит от концентрации фосфатного буфера в очень широком диапазоне – 0,3–1,3 М (рис. 4). Эти данные сильно отличаются от данных для фермента дикого типа, для которого диапазон максимальной нестабильности составляет 0,1–0,35 М [4]. По-видимому, это связано с тем, что термостабильность PseФДГ GAV была увеличена именно за счет мутаций, увеличивающих гидрофобность белковой глобулы.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о более гидрофобном характере белковых глобул формиагдегидрогеназ из растений по сравнению с ФДГ из бактерий *Pseudomonas* sp.101, а успешная стабилизация бактериального фермента путем гидрофобизации его белковой глобулы позволила получить биокатализатор с постоянной стабильностью в широком диапазоне ионной силы.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 05-04-49073а).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ambard-Bretteville F., Sorin C., Rebeille F., Hourton-Cabassa C., Colas des Francs-Small C.* // Plant Molecular Biology. 2003. **52**. P.1153.
2. *Тишков В.И., Попов В.О.* // Биохимия. 2004. **69**. С. 1537.
3. *Tishkov V.I., Popov V.O.* // Biomol. Engineering. 2006. **23**. P. 89.
4. *Федорчук В.В., Галкин А.Г., Ясный И.Е.* и др. // Биохимия. 2002. **67**. С. 1385.
5. *Садыхов Э.Г., Серов А.Е., Войнова Н.С.* и др. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2006. **47**. С. 31.

Поступила в редакцию 23.11.07

## INACTIVATION OF FORMATE DEHYDROGENASES AT PH 8

N.S. Voinova, S.S. Savin, A.A. Alekseeva, O.E. Skirgello, V.I. Tishkov

(Division of Chemical Enzymology)

**Dependence of the first order inactivation rate constant on phosphate buffer concentration (pH 8.0) was studied for recombinant formate dehydrogenases from plant *Arabidopsis thaliana* and soya as well as for mutant formate dehydrogenase from bacterium *Pseudomonas* sp.101 (PseFDH GAV). It was shown that stabilization and destabilization effects can be observed depending on ion strength of solution.**