

УДК 577.151.0

ВЛИЯНИЕ pH СРЕДЫ И ИОННОЙ СИЛЫ НА ТЕМПЕРАТУРНУЮ СТАБИЛЬНОСТЬ РАСТИТЕЛЬНЫХ ФОРМИАТДЕГИДРОГЕНАЗ

А.А. Пометун^{1,2}, Н.С. Войнова³ Е.В. Пометун⁴, С.С. Савин^{2,3}, В.И. Тишков^{1,2,3*}

¹Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН; ²ООО «Инновации и высокие технологии МГУ»; ³Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет; ⁴ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России; *e-mail: vitishkov@gmail.com

Изучено влияние pH среды и ионной силы на термостабильность рекомбинантных формиатдегидрогеназ из модельного растения *Arabidopsis thaliana* (AthFDH) и сои *Glycine max* (SoyFDH). Зависимость остаточной активности от времени описывалась кинетикой реакции первого порядка во всем диапазоне исследованных условий. Показано, что зависимость константы скорости термоинактивации от концентрации фосфатного буфера при разных значениях pH представляет собой колокообразную кривую и имеет довольно ярко выраженный максимум. Показано, что увеличение pH среды приводит к увеличению константы скорости инактивации в случае SoyFDH и снижению таковой в случае AthFDH. Определены активационные параметры процесса термоинактивации, протекающего в разных условиях.

Ключевые слова: формиатдегидрогеназа, кинетические параметры, температурная стабильность, активационные параметры.

NAD⁺-зависимая формиатдегидрогеназа (ФДГ) широко распространена в природе – кодирующие ее гены найдены у многих бактерий, дрожжей, растений, а также у микроскопических грибов [1]. Установлено, что в растениях ФДГ проявляет себя как фермент стресса и ее количество резко возрастает при эндо- и экзогенных стрессовых воздействиях [2].

В нашей лаборатории проводятся систематические исследования формиатдегидрогеназ из разных источников. На настоящий момент клонированы более 15 генов, кодирующих формиатдегидрогеназу. Восемь из них (четыре из бактерий, три из дрожжей, один из растений) клонированы в нашей лаборатории [1–3]. Созданы также генно-инженерные конструкции для суперэкспрессии в *E. coli* ФДГ из растений *Arabidopsis thaliana* (AthFDH) и сои *Glycine max* (SoyFDH), для чего из полноразмерной кДНК были удалены последовательности, кодирующие сигнальные пептиды [4]; кДНК генов AthFDH и SoyFDH были любезно предоставлены проф. Дж.Марквеллом (J. Markwell, Department of Biochemistry, University of Nebraska, USA) и проф. Н. Лабру (Labrou N., Department of Agricultural Biotechnology, Agricultural University of Athens, Greece) Интересно, что среди описанных формиатдегидрогеназ именно растительные ферменты имеют одни

из самых низких значений констант Михаэлиса, что делает эти ФДГ очень перспективными для использования в системе регенерации восстановленного кофактора NADH в биотехнологических процессах [2, 3]. Для эффективного планирования целевого процесса необходимо знать, как молекула фермента будет работать в различных условиях. Поэтому изучение изменения кинетических свойств и температурной стабильности фермента в зависимости от условий среды представляет собой важную и актуальную задачу. В рамках данной работы было изучено влияние ионной силы и pH среды на температурную стабильность рекомбинантных формиатдегидрогеназ из растений *Arabidopsis thaliana* и сои *Glycine max*. Для экстраполяции стабильности ферментов на широкий интервал температур рассчитаны активационные параметры – энтальпия и энтропия активации.

Экспериментальная часть

Материалы

В микробиологических экспериментах применяли бактотриптон, дрожжевой экстракт и агар («Difco», США), глицерин (99,9%) и хлорид кальция («ultra pure»), гидрофосфат калия, дигидрофосфат натрия («pure for analysis»), лизоцим («Fluka/BioChemika», Швейцария), лактозу

«analytical grade», ампициллин и хлорамфеникол («Sigma», США), глюкозу и хлорид натрия («pure for analysis», «Хеликон», Россия). Для очистки и изучения свойств фермента применяли сульфат аммония марки «х.ч.» («Диам», Россия), мочевины марки «ч.д.а.» («РеаХим», Россия), NAD^+ с чистотой не менее 99% фирмы «AppliChem» (Германия), ЭДТА «pure for analysis» фирмы «Merck» (Германия), формиат натрия и дигидрофосфат натрия «ч.д.а.» («РеаХим», Россия), азид натрия фирмы «Serva» (Германия), Трис фирмы «Диам» (Россия), лимонную кислоту «ч.д.а.» («РеаХим», Россия).

Методы исследования

Получение рекомбинантных формиатдегидрогеназ. Экспрессию SoyFDH и AthFDH проводили в клетках *E. coli* BL21(DE3) CodonPlus/pLysS, согласно методике, описанной в работах [4–6]. Музейную культуру культивировали в течение 7–9 ч при 30 °С и 180 об/мин до достижения величины поглощения $A_{600} \approx 0,6–0,8$ в 5 мл среды 2YT (дрожжевой экстракт 10 г/л, бактотриптон 16 г/л, хлорид натрия 5 г/л, pH 7,0) в присутствии 150 мкг/мл ампициллина и 25 мкг/мл хлорамфеникола. Затем содержимое пробирок переносили в конические качалочные колбы с отбойниками объемом 1 л, содержащими 200 мл среды 2YT и 150 мкг/мл ампициллина и культивировали клетки при 30 °С и 80–90 об/мин до достижения величины поглощения $A_{600} = 0,6–0,8$. Далее проводили индукцию клеток, добавляя в среду для культивирования раствор лактозы (300 г/л) до конечной концентрации индуктора 20 г/л. После индукции температуру культивирования для получения SoyFDH снижали до 20 °С, а для AthFDH температура после индукции оставалась 30 °С, затем клетки культивировали в течение 17 ч при 120 об/мин. Полученную биомассу осаждали на центрифуге «Beckman J-21» (США) при 7500 об/мин в течение 20 мин при 4 °С, после удаления культуральной жидкости клетки ресуспендировали в 0,1 М натрий-фосфатном буфере (pH 8,0) в массовом соотношении 1:4. Полученную суспензию замораживали и хранили при –20 °С. Для выделения SoyFDH и AthFDH 20%-ю суспензию клеток в 0,1 М натрий-фосфатном буфере (pH 8,0) подвергали двум циклам заморозки-разморозки, а затем клетки разрушали с помощью ультразвукового дезинтегратора «Branson Sonifier 250» (Германия) при постоянном охлаждении. Осадок удаляли на центрифуге «Eppendorf 5804 R» (11 000 об/мин, 30 мин).

Для очистки рекомбинантных SoyFDH и AthFDH использовали методику, описанную в работах [4–7]. Процедура очистки фермента включала высаживание балластных белков сульфатом аммония (40 и 30% от насыщения для SoyFDH и AthFDH соответственно), осаждение целевого белка при концентрации сульфата аммония 85% от насыщения и его последующее перерастворение в буфере А (0,1 М фосфатный буфер с pH 7,0, содержащий сульфат аммония 45 и 35% от насыщения, для SoyFDH и AthFDH соответственно). Полученный супернатант использовали для гидрофобной хроматографии на колонке, содержащей Phenyl Sepharose Fast Flow (Pharmacia Biotech) в нисходящем градиенте 45–0% (35–0% для AthFDH) концентрации сульфата аммония и гель-фильтрации на колонке, содержащей Sephacryl S200 в фосфатном буфере с указанной выше концентрацией.

Для изучения термостабильности ферменты переводили в буферные растворы с соответствующей концентрацией и значением pH на колонке с Сефадекс G-25. Контроль чистоты полученных препаратов осуществляли с помощью аналитического электрофореза в 12%-м полиакриламидном геле в присутствии 0,1%-го додецилсульфата натрия на приборе для электрофореза «MiniProtean II» фирмы «BioRad».

Определение активности. Активность ФДГ определяли спектрофотометрически по накоплению NADH на длине волны 340 нм ($\epsilon_{340} = 6220 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) на спектрофотометре «Schimadzu UV 1800 PC» при 30 °С в 0,1 М натрий-фосфатном буфере (pH 7,0). Концентрация формиата натрия и NAD^+ в кювете составляла 0,3 М и 1,5 мМ соответственно.

Измерение термостабильности. Термостабильность фермента измеряли в натрий-фосфатном буфере заданной концентрации в диапазоне 0,01–1,00 М при pH 6,0; 7,0 и 8,0. Для каждого эксперимента готовили серию из пластиковых пробирок объемом 0,5 мл по 100 мкл раствора фермента (0,2 мг/мл) в каждой. Пробирки помещали в предварительно прогретый до необходимой температуры водный термостат (48–62 °С, точность термостатирования $\pm 0,1$ °С). В определенные моменты времени отбирали по одной пробирке и переносили в лед на 5 мин, после чего пробирку центрифугировали в течение 3 мин при 12 000 об/мин на центрифуге «Eppendorf 5415D». Остаточную активность ФДГ измеряли, как описано выше. Константу скорости термоинактивации ($k_{\text{ин}}$) определяли как тангенс угла наклона прямой из графика за-

висимости натурального логарифма величины остаточной активности от времени (полулогарифмические координаты $\ln(A/A_0) - t$) методом линейной регрессии, используя программу «Origin Pro 8.5».

Результаты и их обсуждение

Литературные данные по термостабильности ферментов очень часто ограничены. Наиболее популярным показателем термостабильности является температура, при которой фермент теряет 50% активности за 20 или 30 мин. Такие данные не позволяют рассчитать стабильность белка вне диапазона, в котором проводились эксперименты. Кроме того, такие эксперименты проводятся при определенном pH и концентрации буфера, что практически полностью нивелирует возможность применения полученных данных на практике.

В нашей лаборатории для характеристики термостабильности ферментов используются два подхода:

- 1) анализ кинетики термоинактивации при разной температуре [8];
- 2) применение дифференциальной сканирующей калориметрии [9].

Первый подход при использовании теории активированного комплекса позволяет получить активационные параметры процесса, по которым в свою очередь можно рассчитать константы скорости инактивации как при умеренных (20–35 °С), так и при более низких температурах. Еще одним очень важным фактором, который редко встречается при описании экспериментов по термоинактивации белков, является влияние ионной силы и

pH среды на их термостабильность. Варьирование этих параметров приводит к существенным изменениям силы взаимодействия заряженных и гидрофобных остатков как на поверхности, так и внутри белковой глобулы. Поэтому такие изменения могут существенно влиять на температурную зависимость константы скорости инактивации. Мы провели систематические исследования зависимости стабильности двух растительных формиадегидрогеназ при варьировании концентрации фосфатного буфера и при разных значениях pH среды. Соли фосфорной кислоты были выбраны в качестве буфера по двум причинам:

- 1) pH фосфатного буфера практически не зависит от температуры;
- 2) фосфат-ион не является ингибитором формиадегидрогеназ даже при концентрации более 1 М (он имеет большой радиус и практически не проникает внутрь белковой глобулы, поэтому возникающий при изменении концентрации буфера эффект следует считать только отражением изменения ионной силы, а не результатом специфических взаимодействий с белковой глобулой).

Термоинактивация ФДГ из сои и *A. thaliana* протекала по мономолекулярному механизму во всем диапазоне изученных температур. На рис. 1 приведены зависимости остаточной активности ферментов от времени в полулогарифмических координатах. Эти зависимости представляют собой прямые, по тангенсу угла наклона которых можно рассчитать константы скорости инактивации. На первом этапе мы изучили зависимость константы скорости инактивации от концентрации фосфатного буфера при трех

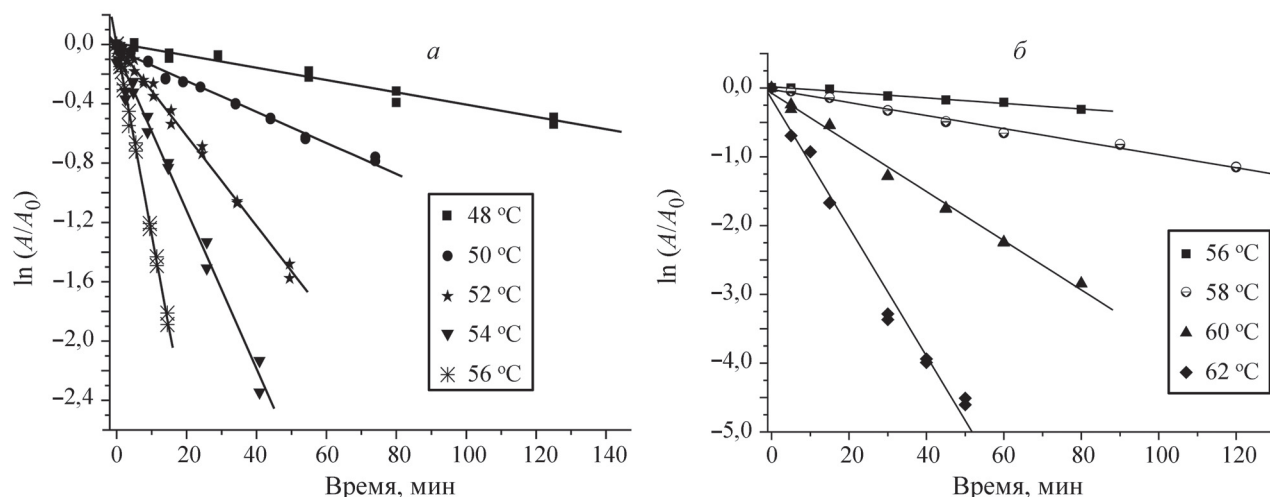


Рис. 1. А. Зависимость натурального логарифма остаточной активности SoyFDH от времени при нескольких значениях температуры (0,1 М натрий-фосфатный буфер, pH 7,0). Б. Зависимость остаточной активности AthFDH от времени в координатах $\ln(A/A_0) - t$ при нескольких значениях температуры (0,04 М натрий-фосфатный буфер, pH 7,0)

значениях pH (6,0; 7,0 и 8,0) при 52 и 58 °C для SoyFDH и AthFDH соответственно. Как следует из (рис. 2), при всех значениях pH зависимость константы скорости инактивации от концентрации фосфат-иона имеет колоколообразный вид. Положение максимума зависит от типа фермента и pH среды, и в среднем он находится в районе концентраций 0,05–0,3 М. Стабильность SoyFDH при переходе от максимума к минимуму возросла в 22,3; 8,7 и 14,2 раза при pH 6,0; 7,0 и 8,0 соответственно. Для AthFDH эти значения составили соответственно 7,7; 9,5 и 7,2.

Таким образом, можно утверждать, что фермент из AthFDH несколько менее чувствителен к изменению ионной силы раствора в этом диапазоне pH. Константы скорости инактивации SoyFDH и AthFDH по-разному зависят от pH среды. Оба фермента демонстрируют минимальную стабильность при pH 6,0. При pH 7,0 и 8,0 значения стабильности близки, но в случае SoyFDH максимальная стабильность наблюдается при pH 7,0, а в случае AthFDH – при pH 8,0. Из полученных данных можно сделать вывод об оптимальных условиях термообработки при выделении ферментов: для SoyFDH рекомендуется использовать буферные растворы с pH 8,0, а для AthFDH – буферные растворы с pH 7,0. В случае и того, и другого фермента для термообработки предпочтительнее использовать буферные растворы с высокой ионной силой – больше 0,5 М.

Далее при трех значениях pH нами была исследована зависимость константы скорости термоинактивации от температуры при двух кон-

центрациях фосфатного буфера (в максимуме и минимуме стабильности) для SoyFDH и при трех концентрациях буфера для AthFDH. Для получения количественных параметров процесса термоинактивации использовали уравнение зависимости константы скорости от температуры из теории активированного комплекса (или теории переходного состояния) [8]:

$$k_{\text{ин.}} = \frac{k_B T}{h} \cdot e^{-\left(\frac{\Delta H^\ddagger}{RT} - \frac{\Delta S^\ddagger}{R}\right)}, \quad (1)$$

где T – температура в градусах Кельвина, h и k – постоянные Планка и Больцмана соответственно, R – универсальная газовая постоянная, ΔH^\ddagger и ΔS^\ddagger – активационные параметры, энтальпия и энтропия активации соответственно. Выражение (1) может быть приведено к линейной форме следующим образом:

$$\begin{aligned} \ln\left(\frac{k_{\text{ин.}}}{T}\right) &= \ln\left(\frac{k_B}{h}\right) + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} - \frac{\Delta H^\ddagger}{RT} = \\ &= \text{const} - \frac{\Delta H^\ddagger}{R} \cdot \frac{1}{T}, \end{aligned} \quad (2)$$

где

$$\text{const} = \ln\left(\frac{k_B}{h}\right) + \frac{\Delta S^\ddagger}{R}. \quad (3)$$

В качестве примера на рис. 3 представлены линейаризованные зависимости констант скорости инактивации от температуры для AthFDH при трех концентрациях фосфатного буфера и pH 7,0. Рассчитанные значения активационных параметров

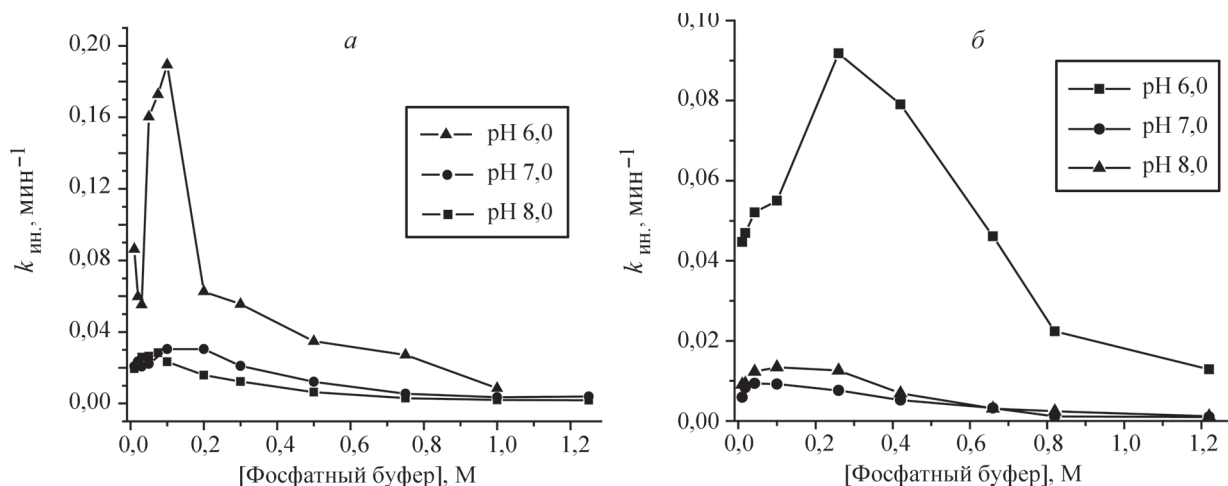


Рис. 2. Зависимость величины константы скорости инактивации от концентрации фосфат-иона (0,01–1,25 М натрий-фосфатный буфер (pH 6,0–8,0)): А – SoyFDH, $T = 52$ °C; Б – AthFDH, $T = 58$ °C

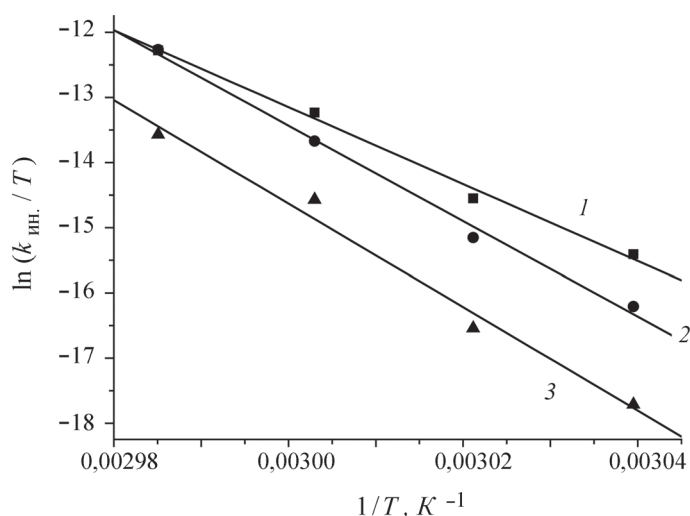


Рис. 3. Зависимость константы скорости инактивации AthFDH от температуры в координатах $[\ln(k_{inh.}/T)] - 1/T$ при разных концентрациях фосфатного буфера, М: 1 – 0,04; 2 – 0,4; 3 – 0,8 (рН 7,0)

Т а б л и ц а 1

Значения активационных параметров для SoyFDH при разных значениях рН среды и концентрации фосфатного буфера

рН	Концентрация натрий-фосфатного буфера, М	ΔH^\ddagger , кДж/моль	ΔS^\ddagger , Дж/(моль·К)
6,0	0,1	240±20	460±70
	1	590±30	1500±90
7,0	0,1	370±20	830±60
	1	440±50	1020±50
8,0	0,075	480±40	1170±70
	1	560±50	1390±60

Т а б л и ц а 2

Значения активационных параметров для AthFDH при разных значениях рН среды и концентрации фосфатного буфера

рН	Концентрация буфера, М	ΔH^\ddagger , кДж/моль	ΔS^\ddagger , Дж/(моль·К)
	0,3	340±50	820±100
6,0	0,7	360±15	780±60
	1,2	273±40	840±120
	0,04	490±30	1200±70
7,0	0,4	610±30	1500±100
	0,8	660±60	1600±100
	0,1	450±40	1050±120
8,0	0,4	490±50	1150±150
	0,8	670±60	1700±170

для SoyFDH и AthFDH представлены в табл. 1, 2, где показано, что как рН среды, так и концентрация фосфатного буфера оказывают большое влияние на зависимость константы скорости инактивации от температуры. Не наблюдается также корреляции изменения значений ΔH^\ddagger и ΔS^\ddagger в зависимости от условий. В целом можно сказать, что в случае AthFDH значения ΔH^\ddagger и ΔS^\ddagger больше, чем в случае SoyFDH. Кроме того, минимальные и максимальные величины ΔH^\ddagger и ΔS^\ddagger различаются в два раза, что свидетельствует о сильном влиянии рН среды и концентрации фосфатного буфера на состояние белковой глобулы.

В заключение можно сказать, что результаты нашего исследования однозначно сви-

детельствуют о важности изучения термостабильности ферментов в широком диапазоне рН и концентрации буферного раствора. Полученные данные позволяют выбрать оптимальные условия работы с ферментами. Например, при создании системы регенерации восстановленного кофермента NAD(P)H в процессах хирального синтеза с помощью оксидоредуктаз, проводимых при рН ниже 7,0, использование ФДГ из сои и *A. thaliana* не будет оптимальным в силу их невысокой стабильности. При данном значении рН более подходит ФДГ из бактерий *Staphylococcus aureus*. Однако при рН 7,0 и выше такой фермент, как SoyFDH (и особенно ее мутантные формы [5, 6, 10]), будет более перспективными биокатализатором.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tishkov V.I., Popov V.O. // Biochemistry (Moscow). 2004. Vol. 69. N 11. P. 1252.
2. Alekseeva A.A., Savin S.S., Tishkov V.I. // Acta Naturae. 2011. Vol. 3. N 4. P. 38.
3. Tishkov, V.I., Popov, V.O. // Biomol. Engineering. 2006. Vol. 23. N 2-3. P. 89.
4. Садыхов Э.Г., Серов А.Е., Ясный И.Е., Войнова Н.С., Алексеева А.А., Петров А.С., Тишков В.И. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2006. Т. 47. № 1. С. 31.
5. Alekseeva A.A., Serenko A.A., Kargov I.S., Savin S.S., Kleimenov S.Yu., Tishkov V.I. // Prot. Eng. Des. Select. 2012. Vol. 25. N 11. P. 781.
6. Kargov I.S., Kleimenov S.Y., Savin S.S., Tishkov V.I., Alekseeva A.A. // Prot. Eng. Des. Select. 2015. Vol. 28. N 6. P. 171.
7. Alekseeva A.A., Savin S.S., Kleimenov S.Yu., Uporov I.V., Pometun E.V., Tishkov V.I. // Biochemistry (Moscow). 2012. Vol. 77. N 10. P. 1199.
8. Fedorchuk V.V., Galkin A.G., Yasny I.E., Kulakova L.B., Rojkova A.M., Filippova A.A., Tishkov V.I. // Biochemistry(Moscow). 2002. Vol. 67. N. P. 1145.
9. Sadykhov E.G., Serov A.E., Voinova N.S., Uglanova S.V., Petrov A.S., Alekseeva A.A., Kleimenov S.Y., Popov V.O., Tishkov V.I. // Appl. Biochem. Microbiol. 2006. Vol. 42. N 3. P. 236.
- 10 Alekseeva A.A., Fedorchuk V.V., Zarubina S.A., Sadykhov E.G., Matorin A.D., Savin S.S., Tishkov V.I. // Acta Naturae. 2015. Vol. 7. N 1 (24). P. 60.

Поступила в редакцию 01.12.17

EFFECT OF MEDIUM pH AND ION STRENGTH ON THERMAL STABILITY OF PLANT FORMATE DEHYDROGENASES

A.A. Pometun^{1,2}, N.S. Voinova³ E.V. Pometun⁴, S.S. Savin^{2,3}, V.I. Tishkov^{1,2,3,*}

(¹A.N. Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences, Leninskiy prospect, 33/2, Moscow 119071, Russian Federation; ²Innovations and High Technologies MSU Ltd, Tsymlyanskya ul., 16-96, Moscow 109559, Russian Federation; ³Department of Chemistry, M.V. Lomonosov Moscow State University; Leninskie Gory, 1-3, Moscow 119991, Russian Federation; ⁴I.M. Sechenov First Moscow State Medical University; *e-mail: vitishkov@gmail.com)

Impact of medium pH and ion strength on thermal stability of formate dehydrogenases (EC 1.2.1.2, FDH) from model plant *Arabidopsis thaliana* (AthFDH) and soya *Glycine max* (SoyFDH) have been studied. Dependence of residual activity on time followed kinetics of reaction of the first order at all experimental conditions.. Dependences of first order thermal inactivation constants showed bell-shape curve. It was found that pH increase resulted in growth of inactivation rate constant for SoyFDH and decrease of one for AthFDH. Activation parameters of thermal inactivation process, ΔH^\ddagger and ΔS^\ddagger , have been calculated from experimental data at different medium pH values and phosphate buffer concentrations.

Key words: formate dehydrogenase, thermal stability, impact of medium parameters, activation parameters of thermal inactivation process.

Сведения об авторах: *Пометун Анастасия Александровна* – науч. сотр. Института биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, ст. науч. сотр. ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», канд. хим. наук (aapometun@gmail.com); *Войнова Наталия Сергеевна* – науч. сотр. ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», канд. хим. наук; *Пометун Евгений Владимирович* – доцент кафедры аналитической, физической и коллоидной химии Института фармации ФGAOУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), канд. хим. наук (epometun@gmail.com); *Савин Святослав Сергеевич* – науч. сотр. химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», канд. биол. наук (savinslava@gmail.com); *Тишков Владимир Иванович* – профессор химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова; зав. лабораторией молекулярной инженерии Института биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской Академии наук; ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», докт. хим. наук (vitishkov@gmail.com).