

УДК 577.15.02

## РОЛЬ ОСТАТКОВ ЦИСТЕИНА В СТАБИЛЬНОСТИ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ФОРМИАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ

Е.Р. Одинцева, А.С. Попова, А.М. Рожкова, В.И. Тишков

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

**NAD<sup>+</sup>-зависимая формиатдегидрогеназа (ФДГ; КФ1.2.1.2) из метилотрофных бактерий *Pseudomonas sp.101* (PseФДГ) обладает наиболее высокой термостабильностью среди всех известных формиатдегидрогеназ, выделенных из различных источников. Инактивация PseФДГ при температуре ниже 45° связана с окислением SH-групп фермента. Ранее проведенные эксперименты по химической модификации SH-групп ФДГ показали наличие двух остатков Cys, влияющих на каталитическую активность ФДГ. Анализ трехмерной структуры фермента свидетельствует о том, что остатки Cys255 и Cys354 расположены на поверхности белковой глобулы. Ранее было показано, что мутации Cys255Ser и Cys255Met приводят к повышению химической стабильности ФДГ более, чем в 100 раз, однако при этом термостабильность снижается в 3 и 10 раз соответственно, и ухудшается сродство к NAD<sup>+</sup>. Полученный нами мутант ФДГ Cys255Ala обладал такой же химической стабильностью, что и мутант Cys255Ser с сохранением кинетических параметров нативной ФДГ. Ухудшение его термостабильности было компенсировано введением дополнительных мутаций, повышающих стабильность ФДГ при температурах выше 50°. В работе были также получены мутанты ФДГ Cys354Ala, Cys354Ser, Cys354Met и изучены их свойства.**

NAD<sup>+</sup>-зависимая формиатдегидрогеназа (ФДГ; КФ 1.2.1.2) широко распространена в природе. Этот фермент обнаружен во многих метилотрофных организмах [1]. На сегодняшний день известны полные последовательности генов ФДГ из 29 источников – это бактерии, дрожжи, грибы и высшие растения. Все ферменты имеют схожие кинетические параметры, однако для бактериальных формиатдегидрогеназ характерна гораздо более высокая стабильность по сравнению с ФДГ из других источников [3]. Самым стабильным среди бактериальных ФДГ является фермент из метилотрофных бактерий *Pseudomonas sp.101* (PseФДГ). Ранее в нашей лаборатории был клонирован и экспрессирован в клетках *E. coli* TG1 ген этого фермента [2]. Для NAD<sup>+</sup>-зависимой ФДГ из *Pseudomonas sp.101* определена трехмерная структура апо- и холо-форм фермента [3]

Механизм инактивации PseФДГ исследован в широком диапазоне температур. Инактивация фермента при температуре ниже 45° связана с окислением или модификацией сульфгидрильных групп фермента. Все выделенные формиатдегидрогеназы имеют существенный для каталитической активности остаток цистеина. В случае PseФДГ было показано, что таким существенным остатком является Cys255, расположенный в коферментсвязывающем домене [5]. Окисление SH-группы этого остатка приводит к полной и необратимой инактивации фермента. Кривая инактивации имеет S-образный вид за счет сложности механизма реакции окисле-

ния. Процесс катализируется ионами переходных металлов, в частности, Cu<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> и Mn<sup>2+</sup> [6, 7]. Ранее было показано, что замена Cys255 на остатки Ser и Met приводит к повышению химической стабильности более чем в 100 раз [8]. Однако в результате мутаций Cys255Ser и Cys255Met наблюдается уменьшение термостабильности PseФДГ в 3 раза, а также ухудшение сродства фермента к NAD<sup>+</sup> в 3 и 6 раз соответственно.

Кроме того, данные по инактивации мутантных форм PseФДГ Cys255Ser и Cys255Met при действии такого специфического реагента, как 5,5'-дитиобис(2-нитробензойная) кислота (ДТНБ), позволяет предположить присутствие в молекуле ФДГ второго влияющего на активность фермента остатка цистеина [8]. Анализ четвертичной структуры ФДГ показывает, что из 7-ми остатков цистеина, приходящихся на одну субъединицу молекулы фермента, доступным для действия модифицирующих реагентов в дополнение к остатку Cys255 может быть остаток Cys354 (рис. 1, а). Сравнение аминокислотных последовательностей ФДГ из разных источников показало, что в небактериальных ферментах этот остаток заменен на остаток Arg (ФДГ из растений) и на остаток Ser (ФДГ из дрожжей и низших грибов) (рис. 1, б).

Целью данной работы было изучение влияния мутации Cys255Ala на стабильность и кинетические свойства PseФДГ, а также выяснение роли остатка Cys354 как второго влияющего на активность фермента остат-

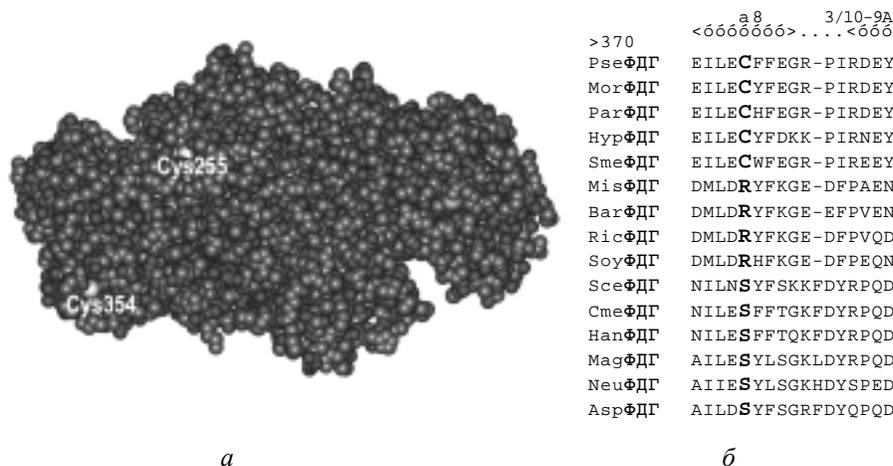


Рис. 1. а – Положение остатков Cys255 и Cys354 в молекуле ФДГ из *Pseudomonas sp.101*; б – сравнение аминокислотных последовательностей формиадегидрогеназ из различных источников в районе остатка Cys354. Бактерии: PseФДГ – *Pseudomonas sp.101*, MorФДГ – *Moraxella sp. C-1*, ParФДГ – *Paracoccus sp.12A*, HyрФДГ – *Hyphomicrobium sp. JC17*, SmeФДГ – *Sinorhizobium meliloti*, высшие растения: StuФДГ – картофель, BarФДГ – ячмень, RicФДГ – рис, SoyФДГ – соя; дрожжи: SceФДГ – пекарские дрожжи, CmeФДГ – *Candida methylica*, HanФДГ – *Pichia angusta*; низшие грибы: MagФДГ – *Magnaporthe grisea*, NeuФДГ – *Neurasporea crassa*, AspФДГ – *Aspergillus nidulans*

ка цистеина. В работе были получены мутанты PseФДГ Cys255Ala, Cys354Ala, Cys354Ser и Cys354Arg, а также изучены их термостабильность и кинетические свойства.

**Методы исследования**

Все реактивы, использованные в экспериментах по генной инженерии, были марки “Molecular Biology Grade” (Sigma). В работе использовали наборы реагентов фирм “Applied Biosystems” (проведение реакций секвенирования), “QIAGEN” (выделение плазмидной ДНК и выделение фрагментов ДНК из геля). Для проведения реакции мутагенеза и клонирования требуемых фрагментов ДНК использовали ДНК-полимеразу фага Т4 (10 ед/мкл), полинуклеотидкиназу фага Т4 (10 ед/мкл), ДНК-лигазу фага Т4 (400 ед/мкл) фирмы “New England Biolabs” и ряд рестриктаз фирм “New England Biolabs” и “Boehringer Mannheim”.

Направленный мутагенез осуществляли по модифицированному методу Кункеля [9–10], как описано в [3]. Для получения мутантов были использованы следующие последовательности олигонуклеотидов (праймеры):

мутация Cys255Ala: 5'-CAC CAC GTC GGC AAC CGG ATA C-3';

мутация Cys354Ala: 5'-CC CTC GAA GAA GGC CTC CAG GAT C-3';

мутация Cys354Ser: 5'-C CTC GAA GAA GCT TTC CAG GAT CTC-3';

мутация Cys354Arg: 5'-C CTC GAA GAA GCG CTC CAG GAT C-3'.

После мутагенеза выделяли плазмиды не менее, чем из 5 отдельных клонов. В каждом случае проводили секвенирование всего гена ФДГ по обеим цепям с целью подтверждения наличия в нем только требуемой мутации. Эффективность мутагенеза была не менее 80%.

Мутанты ФДГ и рекомбинантный фермент дикого типа, экспрессированные в клетках *E. coli* TG1, выделяли и очищали по стандартной методике, разработанной для ФДГ из метилотрофных бактерий *Pseudomonas sp.101* [11]. Чистота полученных препаратов фермента, согласно данным аналитического электрофореза в 12%-м полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия, составляла не менее 90–95%.

Активность и константы Михаэлиса по NAD<sup>+</sup> и формиат-иону для нативной и мутантных форм ФДГ определяли в 0,1 М калий-фосфатном буфере (0,02 М ЭДТА) при 30°, рН 7,0 на спектрофотометре “Shimadzu UV-1601PC” по накоплению NADH при длине волны 340 нм ( $\epsilon_{340} = 6220 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ). Насыщающая концентрация NAD<sup>+</sup> и формиата натрия в кювете составляла 2 мМ и 0,3 М соответственно.

Термостабильность мутантов ФДГ и рекомбинантного фермента дикого типа измеряли при 62°. При измерениях использовали препараты фермента после гelfильтрации на колонке с сефадексом G-25. Для каждого мутанта и ФДГ дикого типа готовили серию образцов: по 100 мкл фермента (0,3 мг/мл) в каждой из 20 пластиковых пробирок на 1,5 мл. Пробирки помещали в предварительно прогретый до температуры 62° водяной термостат (точность температуры  $\pm 0,1^\circ$ ). В моменты отбора проб пробирки с ферментами переносили из водяного термостата в лед на время >30 мин. Константу скорости термоинактивации  $k_{инн}$  определяли из зависимости остаточной активности А от времени в координатах  $\ln A - t$  методом линейной регрессии, используя программу “Sigma Plot 6.0”. Каждое значение константы  $k_{инн}$  для всех изученных форм PseФДГ является средней величиной, полученной из двух независимых экспериментов для каждого из двух выделений конкретного

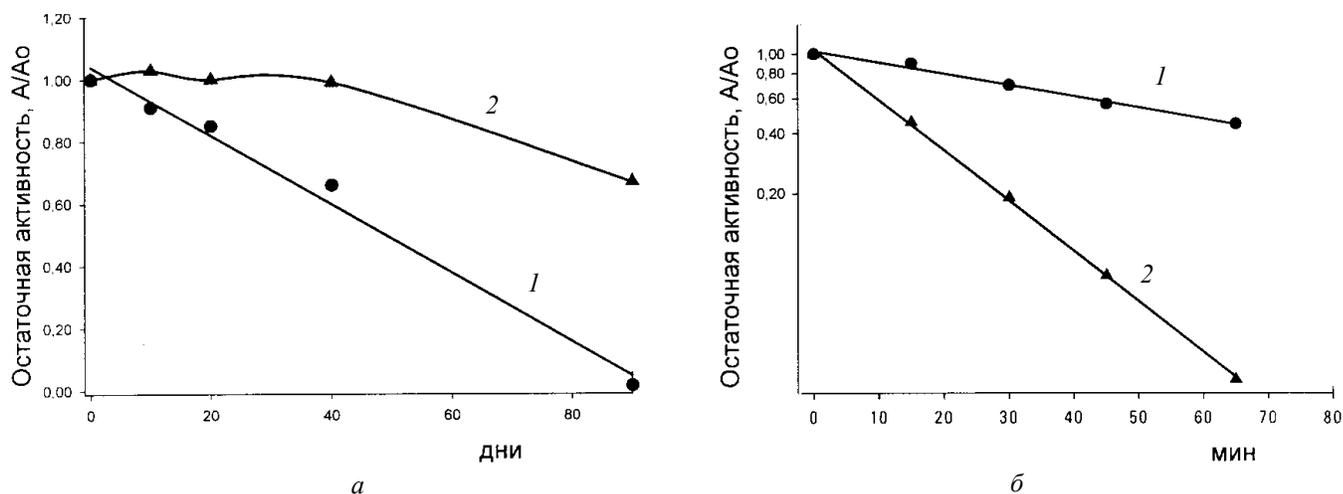


Рис. 2. Зависимость остаточной активности от времени для рекомбинантной PseФДГ дикого типа (1) и мутанта Cys255Ala (2) при  $T$ , °C: а – 40; б – 62

фермента. Анализ трехмерной структуры ФДГ из *Pseudomonas sp.101* проводили с помощью программы “RasMol 2.6b”.

#### Результаты и их обсуждение

В результате аминокислотной замены остатка Cys255 на Ala был получен мутант, обладающий высокой химической стабильностью по сравнению с ферментом дикого типа. При температуре 40° мутант Cys255Ala за 90 дней теряет 30% активности, в то время как фермент дикого типа за этот период инактивируется полностью (рис. 2, а). Кроме того, кинетические параметры мутанта Cys255Ala не отличаются от рекомбинантного фермента. Как было отмечено выше, остаток Cys255 находится в коферментсвязывающем домене и расположен в области между  $\beta$ D-листом и  $\alpha$ D-спиралью. Анализ структуры показывает, что в апо-форме Cys255 экспонирован в раствор, а в холо-форме данный остаток взаимодействует с гидрофобной частью молекулы  $NAD^+$ . По-видимому, такого рода взаимодействием обусловлено ухудшение в 3 раза константы Михаэлиса по  $NAD^+$  для ранее изученных мутантов PseФДГ Cys255Ser и Cys255Met [8].

Однако изучение инактивации мутанта PseФДГ Cys255Ala и фермента дикого типа при 62° показало, что данная аминокислотная замена приводит к снижению термостабильности фермента в 4 раза (рис. 2, б).

Анализ данных рентгеноструктурного анализа PseФДГ показал, что вторым существенным для активности фермента остатком цистеина может быть остаток Cys354, сульфгидрильная группа которого частично расположена на поверхности белковой глобулы (рис. 1, а).

Компьютерное моделирование мутагенеза данного остатка цистеина на Ala, Ser и Arg показало, что наибольшая стабилизация PseФДГ может быть получена в

результате мутации Cys354Arg, поскольку в результате аминокислотной замены на остаток Arg возможно образование дополнительных водородных связей с остатками Glu350 и Pro360. Однако изучение инактивации мутантов PseФДГ Cys354Ala, Cys354Ser, Cys354Arg и фермента дикого типа при 62° показало, что полученные мутанты оказались менее стабильными в 2, 3 и 10 раз соответственно (рис. 3). Изучение влияния остатка Cys354 на химическую стабильность фермента в настоящее время невозможно, так как полученные мутанты PseФДГ содержат также и остаток Cys255, который играет более важную роль в проявлении каталитических свойств ФДГ. Поэтому нами в дальнейшем планируется получить двойные мутанты C255A/C354S и C255A/C354A, в которых химическая стабильность ФДГ будет определяться типом остатка в 354 положении.

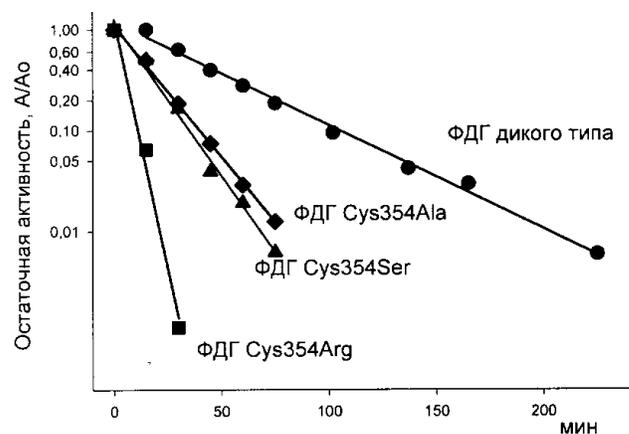


Рис. 3. Зависимость остаточной активности от времени для рекомбинантной PseФДГ дикого типа и мутантов Cys354Ala, Cys354Ser и Cys354Arg при 62°

Полученные данные свидетельствуют о существенном влиянии остатков Cys255 и Cys354 на стабильность бактериальной ФДГ. Замена остатка Cys255 на Ala приводит к повышению химической стабильности более чем в 100 раз по сравнению с ферментом дикого типа, сохранению его кинетических параметров, но сопровождается ухудшением в 4 раза термостабильности фермента. В случае мутации остатка Cys354 термостабильность ФДГ также уменьшалась в 2,5–10 раз. Однако ухудшение термостабильности может быть компен-

сировано введением дополнительных мутаций, обеспечивающих устойчивость PseФДГ к инактивации при повышенных температурах [3]. Кроме того, в нашей лаборатории найдены мутации, обеспечивающие одновременно увеличение сродства PseФДГ к коферменту и увеличивающие его термостабильность в 2,5 раза.

Дальнейшим направлением нашей работы будет получение многоточечных мутантов, объединяющих два типа мутаций, что позволит получить препараты биокатализатора с повышенной химической и термостабильностью.

Данная работа была поддержана грантами РФФИ 99-04-49156, РФФИ 02-04-49415 и контрактом Министерства науки, промышленности и технологий “Биокаталитические технологии”.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Popov V.O., Lamzin V.S. // *Biochem. J.* 1994. **301**. P. 625.
2. Tishkov V.I., Galkin A.G., Marchenko G.N., Tsygankov Y.D., Egorov A.M. // *Biotechnol. Appl. Biochem.* 1993. **18**. P. 201.
3. Rojkova A.M., Galkin A.G., Kulakova L.B., Serov A.E., Savitsky P.A., Fedorchuk V.V., Tishkov V.I. // *FEBS Letters*. 1999. **445**. P. 183.
4. Диков М.М., Карулин А., Осипов А.П., Егоров А.М. // *Биоорганическая химия*. 1979. **5**. С. 1217.
5. Попов В.О., Шумилин И.А., Устинникова Т., Ламзин В.С., Егоров А.М. // *Биоорганическая химия*. 1990. **16**. С. 324.
6. Диков М.М., Осипов А.П., Егоров А.М. // *Биохимия*. 1980. **45**. С. 1554.
7. Попов В.О., Егоров А.М. // *Биохимия*. 1979. **44**. С. 207.
8. Tishkov V.I., Galkin A.G., Marchenko G.N., Egorova O.A., Sheluho D.V., Kulakova L.B., Dementieva L.A., Egorov A.M. // *Biochem. Biophys. Res. Com.* 1993. **192**. P. 976.
9. Kunkel T.A., Roberts J.D., Zakour R.A. // *Methods. Enzymol.* 1987. **154**. P.367.
10. Kunkel T.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1985. **82**. P. 488.
11. Тишков В.И., Галкин А.Г., Гладышев В.Н., Карзанов В.В., Егоров А.М. // *Биотехнология*. 1992. **5**. С. 52.

Поступила в редакцию 25.10.02