

УДК 577.15.02

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ АКТИВНЫХ ЦЕНТРОВ И КАТАЛИТИЧЕСКОЙ КОНСТАНТЫ РЕКОМБИНАНТНОЙ ФОРМИАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ИЗ СОИ *Glycine max*

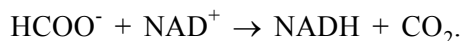
Е.Г. Романова^{1,2}, А.А. Алексеева^{1,2}, Е.В. Пометун³, В.И. Тишков^{1,3}

(¹кафедра химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова; ²ООО "Инновации и высокие технологии МГУ"; ³Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН; e-mail: vitishkov@gmail.com)

Проведен анализ структуры свободной формиатдегидрогеназы и связанной в тройной комплекс с NAD^+ и азид-ионом, который указывает на высокую вероятность эффективного тушения флуоресценции фермента при образовании этого комплекса. Получены спектры возбуждения и флуоресценции апо-фермента, показано, что флуоресценция фермента обусловлена остатками триптофана. Исследована зависимость тушения флуоресценции ФДГ от концентраций NAD^+ и азид-иона. С помощью данных зависимостей определены концентрации активных центров фермента и каталитическая константа рекомбинантной ФДГ из сои *Glycine max*.

Ключевые слова: формиатдегидрогеназа, тушение флуоресценции, концентрация активных центров, каталитическая константа.

NAD^+ -зависимая формиатдегидрогеназа (ФДГ, КФ 1.2.1.2) принадлежит к суперсемейству D-специфичных дегидрогеназ 2-оксикислот. ФДГ катализирует окисление формиат-иона до углекислого газа при сопряженном восстановлении NAD^+ до NADH :



Формиатдегидрогеназы широко распространены в природе и играют важную роль как в обеспечении энергией микробных организмов, так и в ответе на стрессовые воздействия в растениях (засуха, химические реагенты, пониженная температура, неблагоприятный состав почвы и др.) [1]. Данные об активности растительных ФДГ очень противоречивы (0,01-1,40 мкмоль/мг) [2]. Разброс значений активности связан с тем, что методика выделения ФДГ из митохондрий растений достаточно сложна и занимает много времени. Поэтому в ходе выделения происходит частичная инактивация фермента, степень которой изменяется в зависимости от используемой методики.

В нашей лаборатории проводятся систематические исследования по изучению механизма действия и улучшению свойств растительных формиатдегидрогеназ, в том числе и рекомбинантного фермента из сои (SoyФДГ). Для корректного сравнения свойств мутантных SoyФДГ и фермента дикого типа необходимо определять точную концентрацию активных центров и каталитическую константу. Цель данного исследо-

вания – разработка оптимальной методики для определения концентрации активных центров рекомбинантной формиатдегидрогеназы из сои *Glycine max*.

Экспериментальная часть

Рекомбинантную формиатдегидрогеназу из сои получали экспрессией в клетках *E. coli*, как описано ранее [3]. Согласно данным аналитического электрофореза, чистота полученных препаратов рекомбинантной SoyФДГ в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия составляет не менее 98%. Активность формиатдегидрогеназы определяли при 30°C с помощью спектрофотометра "UV1601PC" фирмы "Shimadzu" по образованию NADH на длине волны 340 нм ($\epsilon_{340} = 6220 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Измерения проводили в 0,1 М натрий-фосфатном буфере (pH 7,0). Концентрация формиата натрия и NAD^+ в кювете составляла 0,1 М и 0,4 мг/мл соответственно.

Флуоресценцию свободной формиатдегидрогеназы, а также связанной в комплексы с NAD^+ и азид-ионом, измеряли на спектрофлуориметре "Hitachi MPF-4" ($\lambda = 350 \text{ нм}$) при возбуждении на длине волны 300 нм. Для этого в кварцевую кювету ($V = 3 \text{ мл}$) добавляли 2,1 мл раствора фермента в натрий-фосфатном буфере и раствор NAD^+ до концентрации $2 \times 10^{-4} \text{ М}$ в кювете. Точные концентрации исходных растворов NAD^+ определяли спектрофотометрически на длине волны 260 нм ($\epsilon_{260} = 17800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). При измерении флуоресценции ферментов с разной актив-

ностью использовали всегда одну и ту же концентрацию NAD^+ в кювете, равную 2×10^{-4} М. Затем титровали фермент раствором азид натрия с концентрацией 1×10^{-4} М. Каждый раз после добавления отдельной порции раствора азид-иона проводили измерение флуоресценции. Для определения концентрации активных центров фермента строили зависимость тушения флуоресценции от концентрации раствора азид натрия. Концентрацию активных центров находили по абсциссе точки пересечения касательных к начальному и конечному участкам кривой титрования.

Значение каталитической константы рассчитывали из тангенса угла наклона линейной зависимости начальной скорости реакции (активности фермента) от концентрации активных центров. Обработку экспериментальных данных проводили с помощью программы «Origin Pro 7.5».

Результаты и их обсуждение

Молекула формиатдегидрогеназы состоит из двух идентичных субъединиц, причем каждая из них содержит по 4 остатка триптофана и 12 остатков тирозина. Каждая субъединица имеет по два домена – субстрат- и кофермент-связывающие домены. В качестве примера можно привести структуру формиатдегидрогеназы из растений *Arabidopsis thaliana* (АгаФДГ), аминокислотная последовательность которой имеет очень высокую гомологию с таковой для фермента из сои (85% абсолютного совпадения остатков). Как показано на рис. 1, в апо-форме АгаФДГ активный центр представляет собой полость, находящуюся между двумя доменами. При образовании комплекса с NAD^+ и азид-ионом субъединица ФДГ “схлопывается” (рис. 2) и активный центр переходит

в закрытую конформацию, в которой молекулы кофермента и субстрата практически недоступны растворителю. В каждой субъединице АгаФДГ три остатка триптофана из четырех расположены вблизи активного центра фермента. Более того, один остаток триптофана из одной субъединицы контактирует с активным центром во второй субъединице фермента. Таким образом, можно полагать, что образование тройного комплекса с NAD^+ и азид-ионом может привести к изменению флуоресценции остатков триптофана ФДГ, а точнее, к ее тушению в результате “закрытия” структуры. Этот вывод правомерен и в случае ФДГ из сои, поскольку этот фермент имеет также четыре остатка триптофана на субъединицу, положение которых в аминокислотной последовательности такое же, как и в случае АгаФДГ.

На рис. 2 представлены спектры возбуждения и флуоресценции свободной SoyФДГ, где хорошо видно, что максимум флуоресценции находится на 350 нм, причем его положение не зависит от длины волны возбуждения. Эти данные свидетельствуют о том, что флуоресценция фермента обусловлена остатками триптофана. Для дальнейшей работы мы выбрали длину волны возбуждения 300 нм. Известно, что энергия, излученная одним остатком триптофана, может быть поглощена другим, находящимся по соседству внутри белковой глобулы. Это явление называется резонансным переносом энергии. Чем больше длина волны возбуждения, тем ниже эффективность такого процесса. При возбуждении на длине волны больше чем 300 нм вклад резонансного переноса энергии во флуоресценцию практически отсутствует.

Из литературы известно, что азид-ион – самый сильный из описанных обратимых конкурентных по

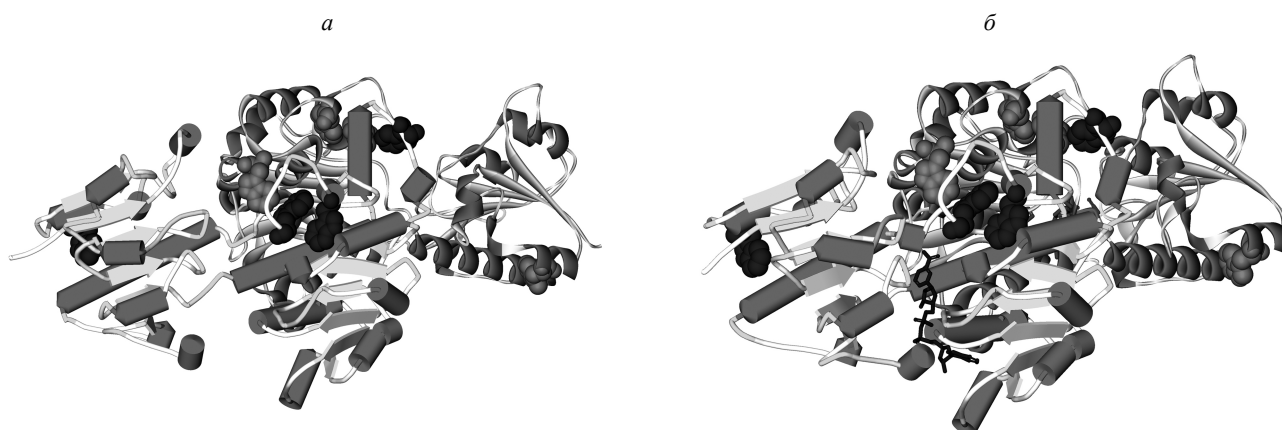


Рис. 1. Структура апо- (а) и холо- (б) форм формиатдегидрогеназы из *Arabidopsis thaliana*. Черными шариками обозначены остатки триптофана, принадлежащие левой субъединице, а серыми шариками – правой субъединице

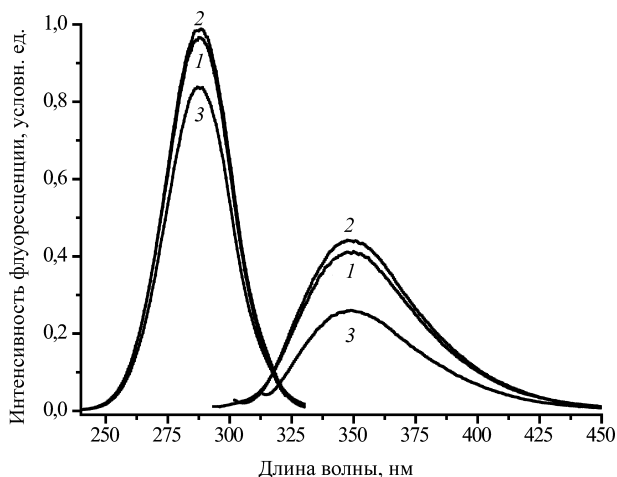


Рис. 2. Спектры возбуждения рекомбинантной формиатдегидрогеназы сои (справа) с измерением флуоресценции на длинах волн ($\lambda_{\text{фл}}$), нм: 1 – 340, 2 – 350 и 3 – 360 и спектры флуоресценции фермента (слева), полученные при длинах волн возбуждения ($\lambda_{\text{возб}}$), нм: 1 – 280, 2 – 290 и 3 – 300 (0,1 М фосфатный буфер, pH 7,0)

формиату ингибиторов формиатдегидрогеназ, как из микроорганизмов, так и из растений [4]. Константа ингибирования ФДГ азид-ионом составляет около 10^{-7} М, при этом ингибитор связывается только с двойным комплексом ФДГ– NAD^+ , но не со свободным ферментом. Поэтому перед изучением тушения флуоресценции фермента под действием азид-иона необходимо было подобрать оптимальную концентрацию NAD^+ . При выборе оптимальной концентрации кофермента необходимо учитывать тот факт, что концентрация NAD^+ не должна быть слишком высокой во избежание эффекта внутреннего фильтра за счет возможного поглощения самого кофермента на длине волны 300 нм. В то же время его концентрация должна быть достаточно высокой, чтобы практически вся SoyФДГ была связана в двойной комплекс. Как показали наши эксперименты, нормированные на концентрацию фермента кривые тушения флуоресценции формиатдегидрогеназы NAD^+ практически не зависят от концентрации SoyФДГ (на рис. 2 не показано). При концентрации NAD^+ в кювете, равной 2×10^{-4} М, тушение флуоресценции достигает ~50% от начальной. Дальнейшее добавление NAD^+ не приводит к заметному изменению флуоресценции, поэтому эта концентрация кофермента (2×10^{-4} М) была выбрана для дальнейшей работы.

На рис. 3 представлены зависимости тушения собственной флуоресценции SoyФДГ азид-ионом в присутствии 2×10^{-4} М NAD^+ при разных концентрациях фермента. Из рисунка хорошо видно, что начальный и конечный участки кривой титрования апроксими-

руются прямыми. Как было показано для ФДГ из бактерий *Pseudomonas* sp.101, абсцисса точки пересечения этих касательных соответствует концентрации активных центров фермента [5]. Следует также отметить, что азид-ион является эффективным тушителем флуоресценции SoyФДГ. Интенсивность остаточной флуоресценции комплекса (SoyФДГ– NAD^+ –азид) составляет не более 14% от таковой для двойного комплекса с NAD^+ . В случае ФДГ из бактерий *Pseudomonas* sp.101 остаточная интенсивность флуоресценции тройного комплекса составляет только 30%. Более высокая остаточная интенсивность флуоресценции в последнем случае, по-видимому, может быть связана с тем, что бактериальный фермент имеет шесть остатков триптофана на субъединицу по сравнению с четырьмя остатками у растительных ФДГ.

Из абсцисс точек пересечения касательных мы определили концентрации активных центров фермента и построили график зависимости активности препаратов фермента от его концентрации. На рис. 4 видно, что между активностью фермента и концентрациями активных центров, определенных методом тушения флуоресценции, существует линейная корреляция. По значению тангенса угла наклона была рассчитана величина эффективной каталитической константы, которая составила $(2,83 \pm 0,27) \text{ с}^{-1}$.

Таким образом, мы разработали методику определения концентрации активных центров рекомбинантной формиатдегидрогеназы из сои *Glycine max*, которая в дальнейшем будет использована для характеристики свойств мутантных ферментов.

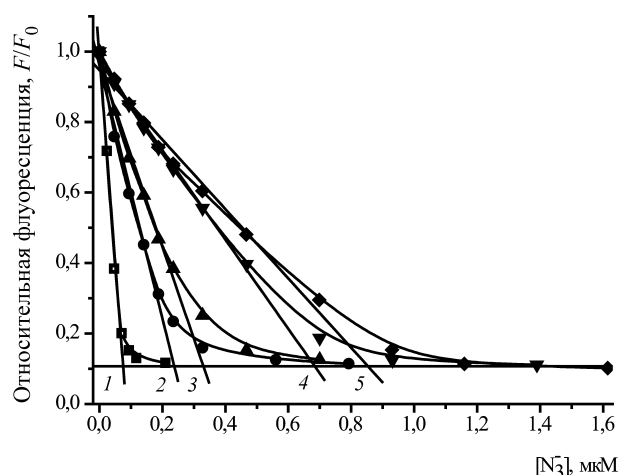


Рис. 3. Титрование активных центров рекомбинантной формиатдегидрогеназы сои; F_0 и F – интенсивность флуоресценции фермента в отсутствие и в присутствии NaN_3 соответственно; $\lambda_{\text{возб}} = 300$ и $\lambda_{\text{фл}} = 350$ нм соответственно; 0,1 М фосфатный буфер (pH 7,0) концентрация $\text{NAD}^+ 2 \times 10^{-4}$ М. Активность препаратов фермента (мкМ/мин): 1 – 10; 2 – 33; 3 – 50; 4 – 110; 5 – 150

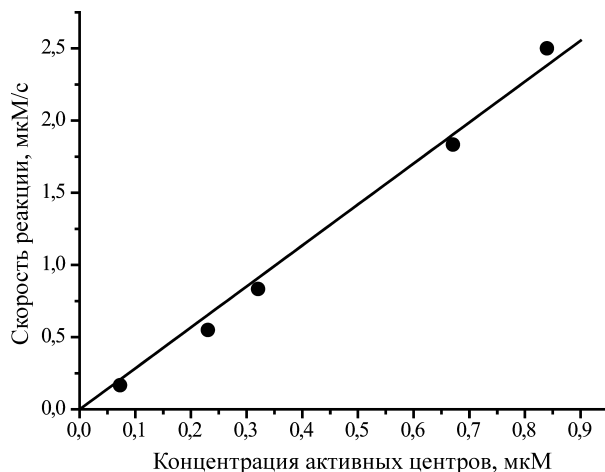


Рис. 4. Определение эффективной каталитической константы рекомбинантной форматдегидрогеназы сои по зависимости активности от концентрации активных центров фермента

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 08-04-01589а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Тишков В.И., Попов В.О. // Биохимия. 2004. **69**. С. 1537.
2. Farinelli M., Fry D., Richardson K. // Plant. Physiol. 1983. **73**. P. 858.
3. Tishkov V.I., Popov V.O. // Biomol. Engineering. 2006. **23**. P. 89.
4. Ohyama T., Yamazaki I. // J. Biochem.(Tokyo) 1975. **77**. P. 845.
5. Попов В.О., Родионов Ю.В., Егоров А.М., Березин И.В. // ДАН СССР. 1978. **239**. С. 1482.

Поступила в редакцию 20.01.10

DETERMINATION OF ACTIVE SITE CONCENTRATION AND CATALYTIC RATE CONSTANT FOR RECOMBINANT FORMATE DEHYDROGENASE FROM SOYA *Glycine max*

E.G. Romanova, A.A. Alekseeva, E.V. Pometun, V.I. Tishkov

(Division of Chemical Enzymology)

Analysis of three-dimension structures of apo- and holo- formate plant dehydrogenase (FDH) shows that binding of the enzyme with azide-ion and coenzyme NAD^+ in ternary complex should result in high quenching of the enzyme fluorescence. Excitation and emission spectra indicated that fluorescence is mainly due to tryptophan residues. Dependences of FDH fluorescence on NAD^+ and azide concentrations were studied. Using these dependences the method for determination of enzyme active site concentrations were developed and catalytic rate constant for recombinant FDH from soya *Glycine max* was calculated.

Key words: formate dehydrogenase, fluorescence, concentration of the active sites, catalytic constant.

Сведения об авторах: Романова Екатерина Геннадьевна – студентка химического факультета МГУ (reg-1990@mail.ru); Алексеева Анастасия Александровна – аспирантка кафедры химической энзимологии, химического факультета МГУ (nalexeyeva@gmail.com); Пометун Евгений Владимирович – науч. сотр. Института биохимии им. А.Н. Баха РАН, канд. хим. наук (epometun@gmail.com); Тишков Владимир Иванович – профессор кафедры химической энзимологии, химического факультета МГУ, докт. хим. наук (vitishkov@gmail.com).