

УДК 577.15.02

## РОЛЬ ОСТАТКОВ TYR62 И TYR165 В СТАБИЛЬНОСТИ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ФОРМИАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ

А. Е. Серов, А. М. Рожкова, В. И. Тишков\*

(кафедра энзимологии химического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова; Воробьевы горы, Москва 119899, Россия; факс: (095) 939-27-42; e-mail: vit@enz.chem.msu.ru)

**NAD<sup>+</sup>-зависимые формиатдегидрогеназы (ФДГ; КФ 1.2.1.2) из метилотрофных бактерий значительно превосходят по термостабильности аналогичные ферменты из других источников – дрожжей, грибов и высших растений. В аминокислотных последовательностях бактериальных ФДГ в 62-м и 165-м положениях находятся остатки Tyr, тогда как в остальных ФДГ в данных участках первичной структуры расположены остатки Phe и Trp. Это может являться одной из причин более низкой стабильности ФДГ из эукариот. Для изучения роли Tyr62 и Tyr165 в стабильности бактериальных формиатдегидрогеназ были получены мутанты ФДГ из метилотрофных бактерий *Pseudomonas sp. 101* (PseФДГ), содержащие аминокислотные замены Tyr62Phe и Tyr165Phe. Показано, что остаток Tyr165 существенно стабилизирует структуру PseФДГ за счет образования водородной связи с основной цепью остатка Gly328, принадлежащего другой субъединице молекулы белка. Замена Tyr62 на Phe не влияет на термостабильность PseФДГ.**

В метаболизме метилотрофов NAD<sup>+</sup>-зависимые формиатдегидрогеназы (ФДГ; КФ 1.2.1.2) играют ключевую роль, катализируя финальный шаг катаболизма C<sub>1</sub>-соединений и обеспечивая метилотрофные организмы энергией и восстановительными эквивалентами [1]. ФДГ состоят из двух идентичных субъединиц с молекулярной массой 36–48 кДа, имеют два активных центра (по одному на субъединицу) и не содержат каких-либо простетических групп и ионов металлов [1].

Диапазон источников, из которых были выделены ФДГ, достаточно широк – это бактерии, дрожжи, грибы и высшие растения. На сегодняшний день известны полные последовательности генов ФДГ из бактерий *Pseudomonas sp. 101* [2], *Mycobacterium vaccae* N10 [3], *Moraxella C-1* (EMBL Accession O08375), дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (EMBL Accession Z75296), *Pichia angusta* (прежнее название *Hansenula polymorpha*) [4], *Candida methylca* [5], *Candida boidinii* [6–7], низших грибов *Aspergillus nidulans* [8], *Neurasporea crassa* [9], из митохондрий картофеля [10] и из ячменя [11].

Для бактериальных формиатдегидрогеназ характерна гораздо более высокая стабильность по сравнению с ФДГ из других источников [12]. Самым стабильным среди бактериальных ФДГ является фермент из метилотрофных бактерий *Pseudomonas sp. 101* (PseФДГ). В присутствии стабилизаторов (ЭДТА) PseФДГ может храниться при 4° более года без потери активности, в то время как ФДГ из метилотрофных дрожжей *Candida methylca* при тех же условиях теряет 50% активности за 2 недели [6].

Бактериальные ферменты отличаются от ФДГ из эукариот тем, что они имеют более длинную N-концевую часть. По-видимому, это отличие является одной из основных причин высокой стабильности бактериальных ФДГ.

Кроме того, существует ряд других особенностей первичной структуры ФДГ из бактерий, которые могут объяснять повышенную устойчивость этих ферментов к тепловой денатурации. Так, в 62-м и 165-м положениях аминокислотных последовательностей бактериальных ФДГ расположены остатки тирозина. В небактериальных ферментах эти остатки заменены на более гидрофобные триптофан и фенилаланин (рис. 1).

Целью данной работы было выяснение роли остатков Tyr62 и Tyr165 в термостабильности ФДГ из метилотрофных бактерий *Pseudomonas sp. 101*. Ген этого фермента был ранее клонирован в нашей лаборатории [2], были также созданы векторные конструкции, обеспечивающие его эффективную экспрессию в клетках *E. coli* [13]. В нашем распоряжении имеются данные о трехмерной структуре апо- и холо-форм ФДГ из *Pseudomonas sp. 101* [14]. В данной работе были получены мутанты PseФДГ Tyr62Phe и Tyr165Phe и изучена их термостабильность.

### Методы исследования

В работе использовали ДНК-полимеразу (10 ед./мкл), ДНК-лигазу (400 ед./мкл) и полинуклеотидкиназу (16 ед./мкл) фага T4 (*New England Biolabs*, США). Все реактивы, использованные для генно-инженерных манипуляций, были марки «Molecular Biology Grade» (*Sigma*).

\*Адресат для переписки.

	$\alpha 1$		$\alpha 5$				
	←————→		←————→				
PseFDH	60	RK <b>Y</b> LESNG	67	·····	163	RN <b>Y</b> LPSHEWARKG	175
MycFDH	60	RE <b>Y</b> LESNG	67	·····	163	RN <b>Y</b> LPSHEWARKG	175
MorFDH	60	RK <b>Y</b> LESQG	67	·····	163	RN <b>Y</b> IPSHDWARNG	175
StuFDH	60	RE <b>W</b> LESKG	67	·····	163	RN <b>F</b> LPGHHQVING	175
BarFDH	58	RD <b>W</b> LESKG	65	·····	161	RN <b>F</b> LPGYQQVVKG	173
SceFDH	33	RN <b>F</b> IEEQG	40	·····	137	RN <b>Y</b> NGGHQQAING	149
CmeFDH	30	AN <b>W</b> LKDQG	37	·····	135	RN <b>F</b> VPAHEQIINH	147
HanFDH	30	RD <b>W</b> LEKQG	37	·····	135	RN <b>F</b> VPAHEQIISG	147
NeuFDH	31	RK <b>W</b> LEDQG	38	·····	136	RN <b>F</b> VPAHEQIQEG	148
AspFDH	26	RK <b>W</b> IEEQG	33	·····	131	RN <b>F</b> VPAHDQIRNG	143

Рис. 1. Аминокислотные последовательности формиадегидрогеназ из различных источников в районах спиралей  $\alpha 1$  и  $\alpha 5$ : PseFDH – *Pseudomonas sp. 101*, MycFDH – *Mycobacterium vaccae* N10, MorFDH – *Moraxella C-1*, StuFDH – картофель, BarFDH – ячмень, SceFDH – *Saccharomyces cerevisiae*, CmeFDH – *Candida methylca*, HanFDH – *Pichia angusta (Hansenula polymorpha)*, NeuFDH – *Neuraspora crassa*, AspFDH – *Aspergillus nidulans*. Жирным шрифтом выделены остатки в 62-м и 165-м положениях. Структурные элементы относятся к ФДГ из *Pseudomonas sp. 101*

Направленный мутагенез осуществляли по модифицированному методу Кункеля [15–16], как описано ранее [12]. При изучении термостабильности для каждого мутанта получали ферментные препараты, используя плазмиды, выделенные из двух независимых клонов. 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* [17]. Чистота полученных препаратов фермента, согласно данным аналитического электрофореза в 12%-м полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия, составляла не менее 90–95%.

Активность формиадегидрогеназы определяли спектрофотометрически по накоплению NADH при длине волны 340 нм ( $\epsilon_{340} = 6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) на спектрофотометре «Beckman D4-8B» (США) при 37° в 0,1 М калий-фосфатном буфере, 0,02 М ЭДТА (рН 7,0). 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 60° в 0,1 М калий-фосфатном буфере (рН 7,0). Для каждого мутанта и ФДГ дикого типа готовили серию из пластиковых пробирок объемом 1,5 мл по 100 мкл раствора фермента (0,3 мг/мл) в каждой пробирке. Пробирки помещали в предварительно прогретый до 60° водяной термостат (точность термостатирования  $\pm 0,1^\circ$ ). В моменты отбора проб пробирки с ферментными препаратами переносились из водяного термостата в лед на время более 30 мин. Константу скорости термоинактивации  $k_{\text{ин}}$  определяли из зависимости остаточной активности A от времени в координатах  $\ln A - t$ , мин с помощью метода линейной регрессии в про-

грамме «Sigma plot 4.0». Каждое значение константы  $k_{\text{ин}}$  для всех изученных форм ПсеФДГ является средней величиной, полученной из двух независимых экспериментов для каждого их двух выделений конкретного фермента (всего 4 измерения). Анализ трехмерной структуры нативной ФДГ из *Pseudomonas sp. 101* проводили на компьютере Pentium II с помощью программы «RasMol 2.6b».

### Результаты экспериментов

Остатки Туг62 и Туг165 расположены в аа-спиральных участках молекулы белка. Туг62 входит в состав спирали  $\alpha 1$ . Анализ структуры ПсеФДГ показывает, что гидроксильная группа Туг62 не образует водородных связей с другими аминокислотными остатками. В целом боковая группа Туг62 находится в гидрофобном окружении. В большинстве эукариотических ФДГ в этом положении аминокислотной последовательности расположен остаток Тгр. Представлялось интересным изучить, как замена Туг62 на более гидрофобную аминокислоту повлияет на термостабильность ПсеФДГ. Однако замена Туг62 на Тгр может привести к возникновению стерических затруднений в молекуле ПсеФДГ. Вклад от удаления гидроксильной группы из данного участка белковой глобулы лучше всего оценить при замене Туг62 на его структурный аналог – Phe.

Остаток Туг165 входит в состав спирали  $\alpha 5$ . Боковая группа Туг165 находится в окружении аминокислотных остатков, принадлежащих другой субъединице фермента (рис. 2, А). Это остатки Ser160, Met157, Leu166 и Gly328 (рис. 2, Б). Можно предположить, что остаток Туг165 играет важную роль в стабильности межсубъединичного контакта. В большинстве ФДГ из эукариот в данном положении находится остаток Phe, который может участвовать лишь в гидрофобных взаимодействиях с остатками

Leu и Met. Анализ трехмерной структуры PseФДГ дает основания предполагать, что гидроксильная группа Tyr165 участвует в образовании водородной связи с карбонильным кислородом основной цепи остатка Gly328. Расстояние между атомами  $O^{OH}(Tyr165)$  и  $O^{-CO-NH}(Gly328)$  составляет 2,8 Å, а угол между атомами С ( $Tyr165$ ),  $O^{OH}(Tyr165)$  и  $O^{-CO-NH}(Gly328)$  равен 115°. Следовательно, в бактериальных ФДГ межсубъединичный контакт стабилизирован дополнительной водородной связью. Для выяснения вклада данной водородной связи в стабильность ФДГ из бактерий необходимо удалить из области контакта гидроксильную группу, не затронув при этом гидрофобные взаимодействия. Такого эффекта можно достичь при замене остатка Tyr на Phe.

Были получены мутанты, содержащие аминокислотные замены Tyr62Phe и Tyr165Phe. Инактивацию мутантов PseФДГ и фермента дикого типа изучали при температуре 60°. Зависимости остаточной ферментативной активности от времени инактивации в полулогарифмических координатах представлены на рис. 3. Линейный вид графиков, а также независимость наблюдаемых констант скорости инактивации от начальной концентрации фермента

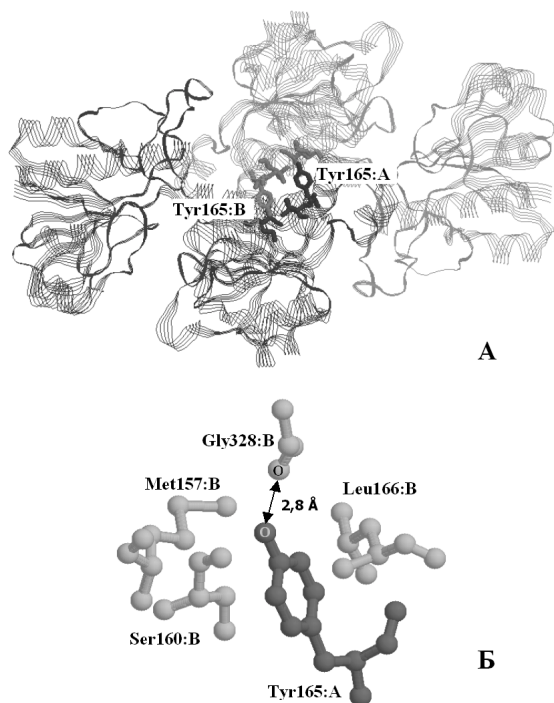


Рис 2. А. Апо-форма формиадгидрогеназы из *Pseudomonas sp. 101* [14]. Б. Структура апо-формы PseФДГ в районе остатка Tyr165. Темный цвет имеют остатки, принадлежащие одной субъединице PseФДГ, светлый цвет – остатки, принадлежащие другой субъединице. Стрелкой обозначена водородная связь между гидроксильной группой остатка Tyr165 и карбонильным кислородом основной цепи остатка Gly328

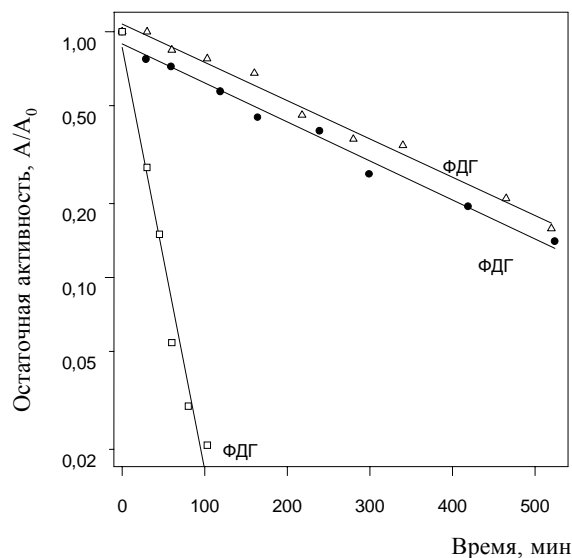


Рис. 3. Зависимости остаточной активности от времени для рекомбинантной PseФДГ дикого типа и мутантов Tyr62Phe и Tyr165Phe при 60°. Шкала ординат представлена в логарифмическом масштабе. Концентрация ферментов 0,3 мг/мл, 0,1 М фосфатный буфер (рН 7,0)

свидетельствуют о протекании термоденатурации PseФДГ и ее мутантов в соответствии с кинетикой реакции первого порядка.

Как следует из рис. 3, константы скорости термоинактивации для рекомбинантной PseФДГ дикого типа и мутанта Tyr62Phe практически идентичны, т.е. данная аминокислотная замена не приводит к изменению термостабильности фермента. При замене Tyr165 на Phe происходит сильное снижение термостабильности PseФДГ (константа скорости инактивации при 60° выросла в результате мутации в 18 раз, что соответствует дестабилизации фермента на 1,9 ккал/моль).

### Обсуждение результатов

Замена Tyr62 на Phe не привела к существенным изменениям термостабильности PseФДГ. Следовательно, наличие в 62-м положении бактериальных ФДГ остатка Tyr не является одной из причин их более высокой по сравнению с ферментами из эукариот термостабильности. Ранее в нашей лаборатории было показано, что эффективным подходом для повышения термостабильности бактериальной ФДГ является гидрофобизация  $\alpha$ -спиралей (замены Ser@ Ala в  $\alpha$ -спиральных участках белка) [12]. Остаток Ala является структурным аналогом остатка Ser, и эффект, который наблюдается при мутации Ser@ Ala, определяется исключительно удалением гидроксильной группы. Среди 20 основных природных аминокислот есть еще только одна подобная пара – Tyr и Phe. Можно предположить, что замены Tyr@ Phe в общем случае также будут приводить к увеличению общей гидрофобности  $\alpha$ -спиралей и как следствие этого стабилизации белка. При замене Tyr165Phe происходит разрушение существенной для стабильности межсубъединичного контакта

водородной связи. Поэтому данная мутация не позволяет оценить вклад, который может вносить замена Tyr<sup>62</sup> Phe в стабилизацию  $\alpha$ -спирали. Боковая цепь остатка Tyr<sup>62</sup> в PseФДГ не образует водородных связей, но его замена на Phe также не приводит к увеличению термостабильности фермента. Это может быть связано с тем, что спираль  $\alpha 1$  в молекуле фермента и так уже достаточно стабильна за счет электростатической связи между Lys<sup>61</sup> и Asp<sup>43</sup>. Эксперименты по направленному мутагенезу ФДГ в положении 61 [3] показали, что разрушение этой связи приводит к увеличению скорости термоинактивации фермента в 4–6 раз.

Полученные данные свидетельствуют о существенном влиянии остатка Tyr<sup>165</sup> на стабильность бактериальных ФДГ. Замена данного остатка на Phe в ФДГ из эукариотических источников сопровождается потерей водородной связи, что, по-видимому, является одной из причин более низкой стабильности этих ферментов. Отметим высокую энергию этой связи, составляющую 1,9 ккал/моль.

Разрушение водородной связи не всегда приводит к дестабилизации структуры белка. В литературе встречаются примеры, когда замена водородной связи гидрофобными контактами вызывает увеличение стабильности. Так, в лизоциме цыпленка остаток His<sup>15</sup> находится вблизи от поверхности белка и образует водородную связь с гидроксильной группой Thr<sup>89</sup> [18]. Однако замена His<sup>15</sup> на Leu оказалась стабилизирующей благодаря вращению вокруг  $\beta$ - $\gamma$ -связи Leu<sup>15</sup>, в результате чего его боковая цепь помещается внутрь гидрофобного ядра. Стабилизация при заменах водородной связи гидрофобными

контактами наблюдалась для лизоцима фага T4 (мутация Ser<sup>117</sup>Phe) [19] и термолизин-подобной нейтральной протеазы из *Bacillus stearothermophilus* (мутация Thr<sup>63</sup>Phe) [20]. Ранее на примере PseФДГ нами было также показано, что замена Ser<sup>131</sup>Ala, сопровождавшаяся потерей водородной связи между боковыми группами Ser<sup>131</sup> и Asp<sup>128</sup>, приводит к увеличению термостабильности фермента [12].

Приведенные примеры подтверждают исключительную важность водородной связи между Tyr<sup>165</sup> и Gly<sup>328</sup> для межсубъединичного контакта в PseФДГ. В данном случае замена Tyr<sup>165</sup> на более гидрофобную аминокислоту не только не стабилизировала структуру белка, но и приводит к ее резкой дестабилизации. Однако необходимо подчеркнуть тот факт, что потеря водородной связи при переходе от ФДГ из бактерий к ферментам из дрожжей, грибов и высших растений частично компенсируется увеличением гидрофобности межсубъединичного контакта. На это указывает проведенный нами анализ аминокислотных последовательностей ФДГ из различных источников. В эукариотических ФДГ Gly<sup>328</sup> заменен на остаток Ala, а расположенный в области контакта Ser<sup>160</sup> – на остатки Val, Leu или Ile.

Межсубъединичный контакт в молекуле PseФДГ очень прочный. Он не разрушается полностью даже в 8 М мочевины. В этих условиях не происходит диссоциации фермента на субъединицы. Мутант PseФДГ Tyr<sup>165</sup>Phe с ослабленным межсубъединичным контактом может быть использован для получения отдельных субъединиц и для изучения их стабильности и каталитических свойств.

Данная работа была выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 99-04-49156).

#### 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. Galkin A.G., Kulakova L.B., Tishkov V.I., Esaki N., Soda K. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1995. **44**. P. 479.
4. Hollenberg C.P., Janowic, Z. // European Patent Application EP 0 299 108 A1, Bulletin 89/03. 1989.
5. Allen S.J., Holbrook J.J. // Gene. 1995. **162**. P. 99.
6. Slusarczyk H., Felber S., Kula M.R., Pohl M. // Eur. J. Biochem. 2000. **267**. P. 1280.
7. Sakai Y., Murdanoto A.P., Konishi T., Iwamatsu A., Kato N. // J. Bacteriol. 1997. **179**. P. 4480.
8. Saleeba J.A., Cobbett C.S., Hynes M.J. // Mol. Gen. Genet. 1992. **235**. P. 349.
9. Chow C.M., RajBhandary U.L. // J. Bacteriol. 1993. **175**. P. 3703.
10. Colas des Francs-Small C., Ambard-Bretteville F., Small I.D., Remy R. // Plant Physiol. 1993. **102**. P. 171.
11. Suzuki K., Itai R., Nakanishi H., Suzuki K., Nishizawa N.K., Yoshimura E., Mori S. // Plant Physiol. 1998. **116**. P. 725.
12. 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.
13. Tishkov V.I., Galkin A.G., Fedorchuk V.V., Savitsky P.A., Rojkova A.M., Gieren H., Kula M.-R. // Biotechnol. Bioeng. 1999. **64**. P. 187.
14. Lamzin V.S., Dauter Z., Popov V.O., Harutyunyan E.H., Wilson K.S. // J. Mol. Biol. 1994. **236**. P. 759.
15. Kunkel T.A., Roberts J.D., Zakour R.A. // Methods Enzymol. 1987. **154**. P. 367.
16. Kunkel T.A. // Proc. Natl. Acad. Sci. 1985. **82**. P. 488.
17. Тишков В.И., Галкин А.Г., Гладышев В.Н., Карзанов В.В., Егоров А.М. // Биотехнология. 1992. **5**. С. 52.
18. Shih P., Kirsch J.F. // Protein Sci. 1995. **4**. P. 2063.
19. Anderson D.F., Hurley J.H., Nickolson H., Baase W.A., Matthews B.W. // Protein Sci. 1993. **2**. P. 1285.
20. Burg B.van den, Dijkstra B.W., Vriend G., van der Vinne B., Venema G., Eijsink G.H. // Eur. J. Biochem. 1994. **220**. P. 981.

Поступила в редакцию 20.06.2000