



УДК 577.152.121\*2.04

## ГИДРОФОБИЗОВАННАЯ ФОРМИАТДЕГИДРОГЕНАЗА ИЗ *Pseudomonas sp. 101* В СИСТЕМЕ ОБРАЩЕННЫХ МИЦЕЛЛ АЭРОЗОЛЯ ОТ В ОКТАНЕ

© 2002 г. Д. Н. Трофимова, А. В. Левашов<sup>#</sup>

Кафедра химической энзимологии, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,  
119899, Москва, Воробьевы горы

Поступила в редакцию 13.09.2001 г. Принята к печати 22.02. 2002 г.

NAD<sup>+</sup>-зависимая формиатдегидрогеназа (FDH) метилотрофных бактерий *Pseudomonas sp. 101* была гидрофобизована пальмитоилхлоридом. Получены образцы с разной степенью модификации (2–10). Проведено сравнительное изучение нативной и модифицированной FDH в системе обращенных мицелл Аэрозоля ОТ в октаноле. На кривой зависимости каталитической активности модифицированного фермента от степени гидратации ПАВ (размеров мицелл) обнаружены три максимума (как и для нативного фермента), отражающие функционирование фермента в форме мономера, димера и октамера. По мере увеличения степени модификации, пик, соответствующий функционированию димера FDH уменьшается в размере. Таким образом, модифицированный фермент преимущественно функционирует в форме мономера и октамера. Модифицированная FDH обладает мембранотропностью и обнаруживает зависимость каталитической активности от концентрации ПАВ.

*Ключевые слова:* формиатдегидрогеназа, химическая модификация, регуляция олигомерного состава; обращенные мицеллы.

### ВВЕДЕНИЕ

На каталитические характеристики ферментов и их стабильность существенное влияние может оказывать гидрофильно-липофильный баланс поверхности белка [1–3]. В природе гидрофобизация белков – широко распространенное явление, в частности, это посттрансляционная модификация жирными кислотами и липидами.

Гидрофобизация белков имеет также и большой практический интерес, например, для их иммобилизации на гидрофобных носителях или для введения в гидрофобные (неводные) реакционные системы. Гидрофобизация придает белкам мембраноактивность, способность взаимодействовать с липидными мембранами, встраиваться в них и проникать в живые клетки [4].

В качестве объекта исследования в работе использована NAD<sup>+</sup>-зависимая формиатдегидрогеназа (FDH) метилотрофных бактерий *Pseudomonas sp. 101* (FDH, КФ 1.2.1.2).

FDH играет важную роль в метаболизме метилотрофных организмов. Этот фермент катализи-

рует последнюю стадию в полиферментной цепи окисления метанола до CO<sub>2</sub>. Белковая глобула FDH состоит из двух идентичных субъединиц (44 кДа каждая) и имеет два взаимонезависимых активных центра. Известно, что в водных растворах FDH функционирует только в виде димера, а в системе обращенных мицелл – в виде мономера, димера и октамера [5].

Из данных рентгеноструктурного анализа [6] известно, что на одну субъединицу FDH приходится 19 аминокислотных групп лизина и часть из них располагается в области межсубъединичного контакта. Химическая модификация (гидрофобизация) FDH может выявить и реализовать дополнительные возможности регуляции активности этого фермента в системах обращенных мицелл. Каталитически важный остаток лизина находится в районе формиатсвязывающего участка активного центра FDH [7], поэтому эффективной защитой от инактивации фермента при модификации является присутствие формиат-иона в реакционной среде.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

#### *Физико-химические характеристики модифицированных препаратов FDH*

Варьированием условий модификации (соотношение белок/пальмитоилхлорид) был получен ряд образцов гидрофобизованного фермента со

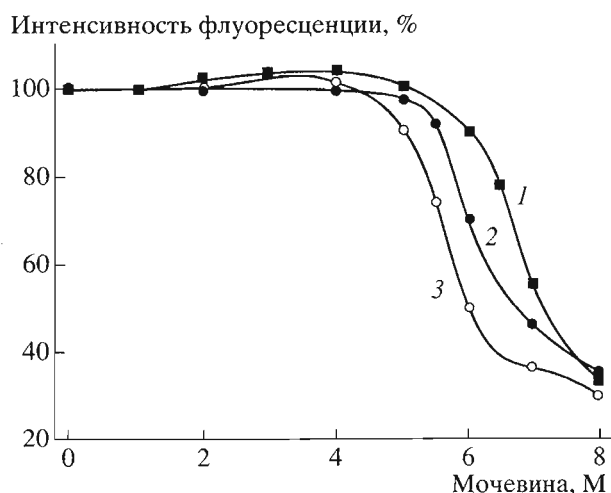
Сокращения: FDH – формиатдегидрогеназа; FDH(Pal<sub>n</sub>) – модифицированная FDH, n – степень модификации; АОТ – Аэрозоль ОТ; PEG – полиэтиленгликоль; DEX – декстран; ПАВ – поверхностно-активное вещество; NAD – никотинамидадениндинуклеотид.

<sup>#</sup> Автор для переписки (тел.: (095) 939-34-29; эл. почта: Levashov@enzyme.chem.msu.ru).

степенью модификации (числом введенных остатков пальмитиновой кислоты на молекулу белка) от 2 до 10.

Относительную гидрофобность нативного и модифицированных препаратов определяли по распределению белка в двухфазной водно-полимерной системе DEX-PEG (табл. 1), где более гидрофобной фазой является PEG, а более гидрофильной – DEX. Значение коэффициента распределения нативной FDH ниже единицы, что указывает на относительно высокую гидрофильность поверхности молекулы фермента. По мере увеличения степени модификации увеличивается и относительная гидрофобность препаратов. При введении в молекулу фермента восьми остатков пальмитиновой кислоты константа распределения увеличивается в 1.65 раза, хотя в целом фермент продолжает оставаться относительно гидрофильным.

Для сравнительной оценки стабильности (прочности межсубъединичных контактов) нативного и модифицированных препаратов было исследовано действие на них денатурирующего агента – мочевины. Поскольку потеря интенсивности собственной флуоресценции связана с процессами разворачивания и диссоциации, то значение концентрации мочевины, соответствующее началу снижения флуоресценции (точка перегиба), может служить мерой прочности межсубъединичных взаимодействий. По мере увеличения степени модификации FDH точка перегиба смещается в сторону меньших концентраций мочевины (рис. 1). Эти результаты свидетельствуют о том, что гидрофобная модификация приводит к ослаблению межсубъединичного контакта.



**Рис. 1.** Зависимость интенсивности собственной флуоресценции препаратов FDH со степенью модификации 0 (1), 5 (2), 10 (3) от концентрации мочевины в растворе.

**Таблица 1.** Относительная гидрофобность модифицированных препаратов FDH( $Pal_n$ ) в системе PEG-6000/DEX-249

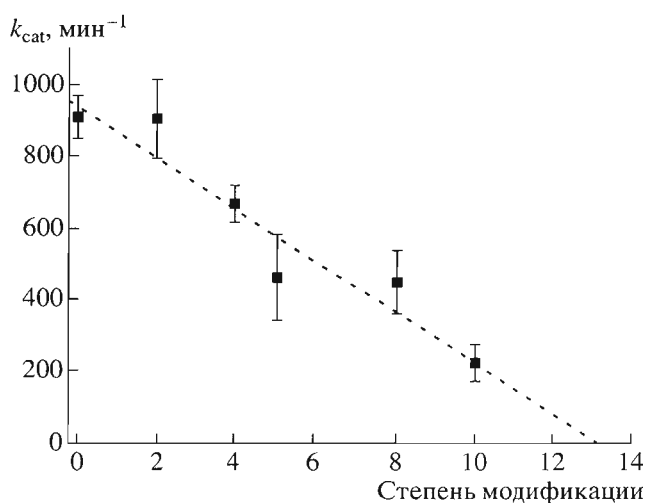
Степень модификации, $n$	$K_{PEG/DEX}$
0 (нативная FDH)	0.28
4	0.32
5	0.34
8	0.46

#### Кинетические свойства препаратов FDH в растворе

Из зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстратов были определены кинетические параметры нативной FDH и ее модифицированных препаратов в растворе. В качестве меры каталитической активности принимали величину максимальной скорости ферментативной реакции, нормированной на концентрацию фермента. В свою очередь концентрацию фермента определяли по стандартной методике [5] исходя из активности фермента, измеренной при насыщающих условиях.

Для всех препаратов модифицированной FDH  $K_m$  по формиату практически неизменна (12–17 мМ). Каталитическая активность препаратов в водной среде линейно зависит от числа модифицированных аминокрупп в белке (рис. 2).

Экстраполяция полученной зависимости показывает, что полная потеря активности фермента происходит при модификации пальмитилохлоридом в молекуле FDH 13 остатков лизина. Существует предположение, что лишь один или ограниченное количество остатков лизина существенны для катализа. Инактивация фермента наступает в



**Рис. 2.** Зависимость каталитической активности препаратов FDH от степени модификации пальмитилохлоридом в буферном растворе.

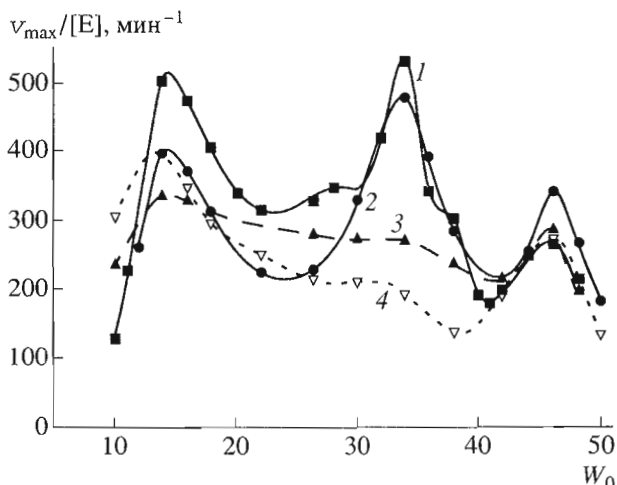


Рис. 3. Зависимость каталитической активности препаратов FDH со степенью модификации 0 (1), 2 (2), 8 (3), 10 (4) в системе обращенных мицелл Аэрозоля ОТ (0.1 М) в октане от степени гидратации ПАВ.

результате блокирования именно этого (этих) остатков на фоне статистической модификации аминокрупп, обладающих приблизительно одинаковой реакционной способностью [7].

#### Кинетические свойства препаратов FDH в системе обращенных мицелл

Зависимость каталитической активности нативной FDH от степени гидратации  $W_0 = [\text{H}_2\text{O}]/[\text{ПАВ}]$  в системе обращенных мицелл Аэрозоля ОТ в октане представляет собой кривую с тремя четко выраженными максимумами (рис. 3, кривая 1). Три оптимума наблюдаются при степенях гидратации 14, 33 и 46. Согласно предложенной ранее концепции геометрического соответствия [8, 9], максимум на зависимости каталитической активности ферментов от степени гидратации ПАВ наблюдается при совпадении диаметра внутренней полости обращенной мицеллы и размера молекулы фермента.

Методом динамического светорассеяния нами были определены размеры (внешний диаметр) пустых и FDH-содержащих мицелл Аэрозоля ОТ при степенях гидратации, соответствующих на-

Таблица 2. Внешний диаметр ( $D$ , нм) содержащих и не содержащих FDH мицелл АОТ в октане при различных степенях гидратации

Препарат	$W_0$ 14	$W_0$ 33	$W_0$ 48
Мицеллы без фермента	6–8	14–16	27–30
Мицеллы с FDH	8–12	14–17	26–31

Концентрация FDH 25 мкг/мл.

блюдаемым оптимумами ферментативной активности (табл. 2). Диаметр внутренней полости при этом меньше внешнего на удвоенную длину молекул ПАВ мицеллы (около 2.5 нм).

Из приведенных в табл. 2 данных видно, что при низкой степени гидратации ( $W_0 = 14$ ) наблюдается увеличение диаметра мицелл при включении в них молекулы белка. По величине приращения размера белоксодержащей мицеллы (2–4 нм) можно сделать заключение, что встраивание FDH в мицеллярную матрицу происходит в виде мономера. Отсюда следует, что первый максимум на рис. 3 обусловлен функционированием мономерной формы FDH. Сопоставляя размеры мицеллярной матрицы с линейными размерами димерной молекулы FDH (10.0 × 6.6 × 6.0 нм, [10]) можно видеть, что в условиях второго оптимума наблюдается совпадение диаметра мицеллы и большой оси молекулы фермента. Третий максимум обусловлен существованием крупных агрегатов. Методом скоростной седиментации было показано существование и функционирование в этой области октамера фермента [5]. Таким образом, наблюдаемый на рис. 3 профиль активности отражает функционирование мономерной, димерной и октамерной форм нативной FDH.

При введении в молекулу фермента остатков жирной кислоты профиль зависимости каталитической активности от степени гидратации ПАВ изменяется (рис. 3, кривые 2–4).

У модифицированного фермента с низкими степенями модификации ( $n = 2–4$ ), как и у нативного фермента, наблюдаются три максимума на профиле каталитической активности. С увеличением степени модификации максимум при  $W_0 = 33$  исчезает, а максимумы при  $W_0 = 14$  и 46 остаются. Отметим, что пик, соответствующий димеру, исчезает постепенно, а не скачкообразно. Можно предположить, что димер (в случае модифицированной FDH) или не образуется вовсе, или не активен.

Сравнение описанных выше результатов с данными по собственной флуоресценции FDH в растворах мочевины дает основание полагать, что гидрофобная модификация фермента приводит к ослаблению межсубъединичных взаимодействий и при увеличении степени модификации образование и стабилизация несферического димера гидрофобизованной FDH в системе обращенных мицелл не происходит. Октамер же FDH аппроксимируется сферой и в отличие от несферического димера может дополнительно стабилизироваться сферической мицеллярной матрицей.

#### Мембранотропность гидрофобизованной FDH

Существуют две группы ферментов: мембранные и плазматические [8]. Одним из тестов на

мембраноактивность ферментов является зависимость каталитической активности от концентрации ПАВ.

При степени гидратации 22 (рис. 4а) фермент функционирует в виде равновесной смеси мономера и димера. В этом случае каталитическая активность практически не зависит от концентрации ПАВ ни для нативной, ни для модифицированной FDH. Для препарата FDH с  $n = 10$  наблюдается даже некоторое ухудшение каталитической активности при уменьшении концентрации ПАВ.

Такое необычное поведение гидрофобизованных препаратов может быть связано с тем, что молекула FDH не сферична [10]. При взаимодействии несферической белковой глобулы FDH с мицеллярной матрицей результирующий эффект обуславливается рядом факторов. С одной стороны, при встраивании белка в мицеллу происходит затормаживание его конформационной подвижности, что может способствовать фиксации каталитической конформации и, таким образом, увеличивать каталитическую активность. С другой стороны, под действием сферической матрицы мицелл АОТ происходит деформация несферической молекулы фермента, и за счет этого наблюдается потеря активности.

Для упрощения системы (чтобы исключить неблагоприятные взаимодействия, связанные с несоответствием форм мицеллы и включенного белка) мы изучили поведение препаратов FDH при степени гидратации 46, т.е. в условиях, когда функционирует сферический октамер фермента (рис. 4б).

При этой степени гидратации наблюдается ожидаемое различие в зависимости проявления каталитической активности нативной и модифицированной FDH от концентрации ПАВ. Для немодифицированного фермента значение каталитической активности при постоянной степени гидратации не зависит от концентрации АОТ. В случае же модифицированной FDH каталитическая активность увеличивается в 6 раз при варьировании концентрации ПАВ от 0.3 до 0.05 М.

Таким образом, изменение гидрофильно-липофильного баланса путем искусственной гидрофобизации FDH остатками жирной кислоты приводит к изменению и модуляции свойств фермента в системе обращенных мицелл. Более гидрофобный фермент характеризуется уменьшением прочности межсубъединичных взаимодействий и приобретает мембранотропность.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Раствор препарата рекомбинантной NAD-зависимой формиатдегидрогеназы метилотрофных бактерий *Pseudomonas sp. 101* (концентрация

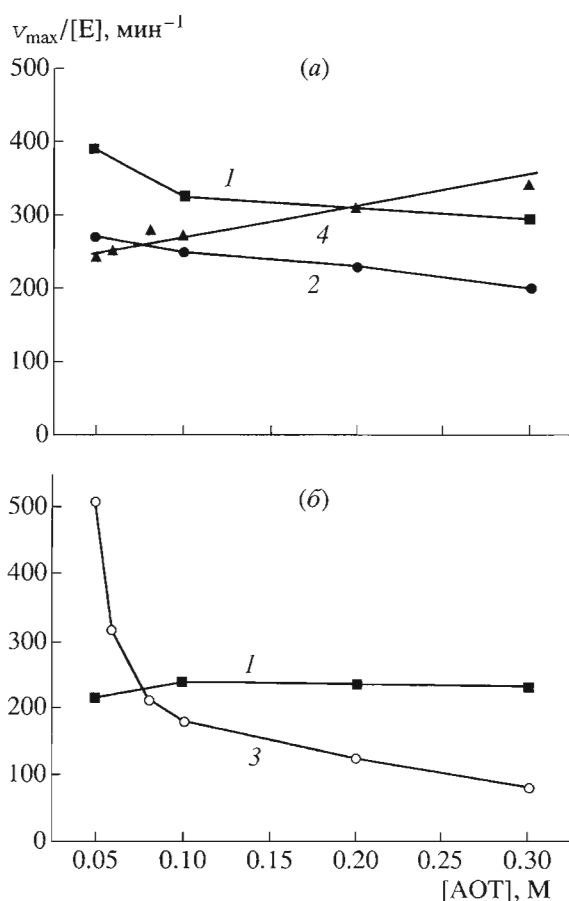


Рис. 4. Зависимость каталитической активности препаратов FDH со степенью модификации 0 (1), 2 (2), 8 (3), 10 (4) в системе обращенных мицелл от концентрации ПАВ при степенях гидратации 22 (а) и 46 (б).

5 мг/мл, удельная активность 15.8 ед/мг) был предоставлен проф. В.И. Тишковым (МГУ).

В работе использовали никотинамидадениндинуклеотид ( $\text{NAD}^+$ , применяли без дополнительной очистки), натриевую соль ди(2-этилгексилового эфира) сульфоянтарной кислоты (Аэрозоль ОТ, АОТ), тринитробензолсульфокислоту (TNBA) (Sigma, США), полиэтиленгликоль (PEG,  $M$  6000 Да) и декстран-249 (DEX) (Loba feinchemie, Австрия), EDTA, формиат натрия ("ос.ч."),  $n$ -октан ("ч.д.а.", абсолютировали обработкой натрием и очищали перегонкой) и компоненты буферных растворов (Реахим, Россия). Пальмитоилхлорид получали по методике [11] действием хлористого тионила на пальмитиновую кислоту.

**Концентрацию активного фермента в препаратах FDH** определяли по стандартной методике [5]. К 1.84 мл 0.02 М  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  буфера (рН 8.5) добавляли 10 мкл 0.3 М раствора  $\text{NAD}^+$  и 300 мкл 3 М раствора формиата натрия. Реакцию инициировали введением 50 мкл раствора FDH и фиксиро-

вали спектрофотометрически накопление образующегося NADH при 340 нм ( $\epsilon = 6220 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ ) и температуре 37°C. Эксперименты проводились на спектрофотометре Shimadzu UV 265 FW (Япония).

По соотношению полученной величины скорости реакции с удельной активностью FDH (15.8 ед/мг) определяли концентрацию активного фермента в мг/мл.

**Кинетические параметры препаратов FDH** определяли спектрофотометрически на длине волны 340 нм при 25°C и pH 8.5.

Для водных растворов в кювету к 0.02 М  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  буферу добавляли 10 мкл 0.3 М раствора  $\text{NAD}^+$  и 5–100 мкл 3 М раствора формиата натрия. Реакцию инициировали введением 50 мкл раствора препарата FDH. Конечный объем смеси 2.2 мл.

Для мицеллярных систем к 2 мл 0.1 М раствора АОТ в октане добавляли 0–170 мкл 0.02 М  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  буфера, 10 мкл 0.3 М водного раствора  $\text{NAD}^+$ , 10 мкл раствора фермента (исходные концентрации препаратов фермента варьировались в пределах от 1.9 до 5.0 мг/мл) и встряхивали до получения гомогенного оптически прозрачного раствора. Реакцию инициировали введением 5–100 мкл 0.3 М раствора формиата натрия.

**Модификацию FDH** проводили по аминокруппам лизина хлорангидридом пальмитиновой кислоты [12].

К 0.8 мл 6 мг/мл раствора фермента в 0.1 М  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (pH 8.5) добавляли 25 мкл 3 М раствора формиата натрия. Реакцию инициировали добавлением 10–120 мкл раствора пальмитоилхлорида в ацетонитриле (1 : 1). Через 30 мин препарат фильтровали через фильтр с размером пор 0.22 мкм. Модифицированную FDH отделяли от низкомолекулярных реагентов методом гель-фильтрации на хроматографической системе низкого давления с использованием колонки Sephadex G-25 fine, предварительно уравновешенной  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  буфером (20 mM, pH 8.5, 20 mM EDTA). Содержание белка контролировали по поглощению при 280 нм. Полученный препарат фермента концентрировали с использованием концентратора Minicom (Amicon, США).

Степень модификации FDH зависела от молярного отношения ацилирующий агент/белок. При 7000-кратном избытке модифицирующего агента достигалась максимальная степень модификации, соответствующая введению в молекулу белка 10 остатков пальмитиновой кислоты (по данным титрования аминокрупп).

**Определение коэффициента распределения FDH в двойной системе DEX–PEG** [13]. К 0.348 мл 12.18% раствора DEX-249 и 0.15 мл 6% раствора PEG-6000 в 0.11 М  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (буфер А, pH 7.4) добавляли 0.1 мл раствора фермента в буфере А (1–5 мг/мл) и доводили до объема 1 мл буфером

А. Раствор перемешивали и для расслоения фаз центрифугировали 30 мин при 5000 об/мин (при таких соотношениях концентраций объемы образующихся гидрофильной и гидрофобной фаз равны). Спектрофотометрически (по поглощению при 280 нм) определяли концентрацию фермента в верхней и нижней фазе. Коэффициент распределения  $K$  определяли как отношение концентраций распределяемого вещества в верхней фазе (PEG) системы к его концентрации в нижней фазе (DEX).

**Степень модификации препаратов FDH** определяли титрованием аминокрупп белка TNBA [14]. Перед титрованием анализируемый препарат FDH диализовали против 500-кратного объема дистиллированной воды в течение 1 сут при +4°C.

**Размер мицелл** определяли методом динамического светорассеяния на приборе Zetasizer 3000 (Malvern Instruments) при 25°C. Использовали аргоновый лазер (длина волны 488 нм, мощность 70 мВ, угол 90°) и кювету с длиной оптического пути 1 см (общий объем 2 мл)

**Интенсивность собственной флуоресценции нативной и модифицированных форм FDH** измеряли при длине волны 345 нм на люминесцентном спектрометре LS50B (Perkin–Elmer, Швеция). Во флуориметрическую кювету с длиной оптического пути 1 см, содержащую 2.0 мл 0.1 М  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  буфер (pH 8.5) и мочевины в концентрации 0–8 М, добавляли 10 мкл раствора фермента с концентрацией 0.2–0.5 мг/мл. Длина волны возбуждения составляла 295 нм.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают признательность проф. В.И. Тишкову (МГУ) за предоставленные образцы бактериальной FDH.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов Израильского правительства (“Новые коллоидные наноструктуры на основе ферментов для целей биотехнологии”) и NWO Голландии (№ 047-007-005).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Plou F.J., Ballesteros A. // FEBS Lett. 1994. V. 399. P. 200–204.
2. Schultz A.M., Henderson L.E., Oroszlan S. // Annu. Rev. Cell. Biol. 1988. V. 4. P. 611–647.
3. Kabanov A.V., Levashov A.V., Alakhov V.Y. // Protein Eng. 1989. V. 3. P. 39–42.
4. Mozhaev V.V., Siksnis V.A., Melik-Nubarov N.S., Galcantaitė N.Z., Denis G.J., Bbutkus E.P., Zaslavsky B.Y., Mestechkima N.M., Martinek K. // Eur. J. Biochem. 1988. V. 173. P. 147–154.

5. Клячко Н.Л., Вакула С.В., Гладышев В.Н., Тишков В.И., Левашов А.В. // Биохимия. 1997. Т. 62. С. 1683–1687.
6. Lamzin V.S., Dauter Z., Popov V.O., Harutyunyan E.H., Wilson K.S. // J. Mol. Biol. 1994. V. 236. P. 759–762.
7. Попов В.О., Тишков В.И., Дайниченко В.В., Егоров А.М. // Биохимия. 1983. Т. 48. С. 747–755.
8. Левашов А.В. // Биотехнология. Итоги науки и техники ВИНТИ АН СССР. 1987. Т. 4. С. 112–158.
9. Klyachko N.L., Levashov A.V., Kabanov A.V., Khmel'nitsky Yu.L., Martinek K. // Kinetics and Catalysis in Microheterogeneous Systems, Surfactant Sci., Ser. V. 38 / Eds Gratzel M., Kalyanasunderam K. New York: Marcel Dekker, 1991. P. 135–181.
10. Egorov A.M., Avilova T.V., Dickov M.M., Popov V.O., Rodionov Yu.V., Berezin I.V. // Eur. J. Biochem. 1979. V. 99. P. 569–579.
11. Hodman C.D. Handbook of Chemistry and Physics. Cleveland: Chemical Rudder Publishing Co., 1951. V. 1. P. 1414.
12. Torchilin V.P., Omelyanenko V.G., Klibanov A.L., Mikhailov A.I., Goldanskii V.I., Smirnov V.N. // Biochim. Biophys. Acta. 1980. V. 602. P. 511–521.
13. Gulyaeva N., Zaslavsky A., Lechner P., Chait A., Zaslavsky B. // J. Chromatogr. B. 2000. V. 743. P. 187–194.
14. Fields R. // J. Biochem. 1971. V. 124. P. 581–590.

## Hydrophobized Formate Dehydrogenase from *Pseudomonas sp. 101* in the System of Reverse Micelles of Aerosol OT in Octane

D. N. Trofimova and A. V. Levashov<sup>#</sup>

<sup>#</sup> Phone: +7 (095) 939-3429; e-mail: levashov@enzyme.chem.msu.ru

Chair of Chemical Enzymology, Faculty of Chemistry, Moscow State University, Vorob'evy gory, Moscow, 119899 Russia

NAD<sup>+</sup>-dependent formate dehydrogenase (FDH) was hydrophobized with palmitoyl chloride to give the samples with various modification degrees (2–10). The native and modified FDHs were comparatively studied in the system of reverse micelles of Aerosol OT in octane. Like the native, the modified enzyme displayed three maxima in the curve of dependence of its catalytic activity on the degree of surfactant hydration (the micelle size), which reflect the enzyme functioning in the form of a monomer, dimer, or octamer. The peak corresponding to the functioning of the FDH dimer was found to decrease along with an increase in the modification degree. Thus, the modified enzyme mainly functions in the form of monomer and octamer. The modified FDH displayed membranotropy and revealed the dependence of catalytic activity on surfactant concentration. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2002, vol. 28, no. 5; see also <http://www.maik.ru>.

*Key words:* formate dehydrogenase, chemical modification, regulation of oligomeric composition; reverse micelles