

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

УДК 577.15.01

**ВЛИЯНИЕ ПРИРОДЫ БУФЕРНОГО РАСТВОРА
НА КАТАЛИТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ NAD⁺-ЗАВИСИМОЙ
ФОРМИАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ИЗ БАКТЕРИЙ *STAPHYLOCOCCUS
AUREUS***

**Татьяна Сергеевна Юрченко¹, Сэсэг Баторовна Болотова¹, Анастасия
Аркадьевна Логинова¹, Евгений Владимирович Пометун³, Святослав
Сергеевич Савин¹, Анастасия Александровна Пометун^{1,2}, Владимир
Иванович Тишков^{1,2}**

¹ Химический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

² Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Россия

³ Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), Москва, Россия

Авторы, ответственные за переписку: Владимир Иванович Тишков, vitishkov@gmail.com; Анастасия Александровна Пометун, aapometun@gmail.com

Аннотация. NAD⁺-зависимая формиатдегидрогеназа из бактерий *Staphylococcus aureus* (SauФДГ, КФ 1.2.1.2) является самым активным ферментом среди известных ФДГ данного типа, однако из-за высоких значений K_M как по NAD⁺, так и по формиату, ее каталитическая эффективность k_{cat}/K_M по обоим субстратам в фосфатном буфере меньше таковых для других формиатдегидрогеназ. Проведено исследование влияния природы буферного раствора на каталитические свойства SauФДГ. Были определены значения k_{cat} и K_M по обоим субстратам в буферных системах на основе фосфата натрия (NaPB) в двойных, тройных и четверных буферных системах, содержащих Tris, Gly и цитрат-ион (Cit). Показано, что использование этих буферов не влияет на K_M по формиату, в то время для k_{cat} и $K_M^{NAD^+}$ наблюдались значительные изменения (как повышение, так и уменьшение). Наибольший положительный эффект был получен в случае четверного буфера NaPB-Cit-Tris-Gly. При концентрации каждого компонента 0,05 М значение k_{cat} возрастает на 70% по сравнению со стандартным 0,1 М фосфатным буфером, а при концентрации каждого компонента 0,1 М улучшаются как k_{cat} , так и $K_M^{NAD^+}$. На примере фосфатного и четверного буфера показано, что при концентрации соли(ей) 0,1 М и выше происходит увеличение термостабильности SauФДГ, причем эффект стабилизации зависит от величины ионной силы и не зависит от природы буфера. Сравнение трехмерных структур холо-форм SauФДГ и ФДГ из бактерий *Pseudomonas* sp.101 свидетельствует, что в отличие от PseФДГ активный центр SauФДГ даже в комплексе с субстратом доступен растворителю и компонентам буфера, что может быть причиной изменения значений k_{cat} и $K_M^{NAD^+}$ в буферных растворах разного состава.

Ключевые слова: NAD⁺-зависимая формиатдегидрогеназа, комбинированные буферные системы, каталитическая активность, термостабильность

Список сокращений: ФДГ – форматдегидрогеназа, NaPB – натрий-фосфатный буфер, Gly – глицин, Tris – трис(гидроксиметил)аминометан, Cit – цитрат.

Финансирование. Исследование выполнено при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 20-04-00915.

Для цитирования: Юрченко Т.С., Болотова С.Б., Логинова А.А., Пометун Е.В., Савин С.С., Пометун А.А., Тишков В.И. Влияние природы буферного раствора на каталитическую активность NAD^+ -зависимой форматдегидрогеназы из бактерий *Staphylococcus aureus* // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. Т. 63. № 6. С. 405–417.

ORIGINAL ARTICLE

**INFLUENCE OF THE COMPONENTS OF BUFFER SOLUTION
ON THE CATALYTIC ACTIVITY OF THE NAD^+ -DEPENDENT FORMATE
DEHYDROGENASE FROM THE BACTERIUM *STAPHYLOCOCCUS
AUREUS***

Tatyana S. Iurchenko¹, Seseg B. Bolotova¹, Anastasia A. Loginova¹, Evgeny V. Pometun³, Svyatoslav S. Savin¹, Anastasia A. Pometun^{1,2}, Vladimir I. Tishkov^{1,2}

¹ Department of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

² Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Centre “Fundamentals of Biotechnology” of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

³ Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation

Corresponding author: Vladimir I. Tishkov, vitishkov@gmail.com; Anastasia A. Pometun, aapometun@gmail.com

Abstract. NAD^+ -dependent formate dehydrogenase (FDH, EC 1.2.1.2) from bacterium *Staphylococcus aureus* (SauFDH) is the most active enzyme among FDHs of this group, but high values of K_M of the enzyme with NAD^+ and formate in standard 0.1 M phosphate buffer result in lower catalytic efficiency k_{cat}/K_M compared to ones for other FDHs. We have studied influence of different buffers on catalytic properties of SauFDH. Sodium phosphate (NaPB) was used as the base buffer component and Tris, Gly and citrate (Cit) were added to NaPB to prepare double, ternary and quaternary buffer systems with different concentrations. It was found that K_M for formate does not depend on buffer composition and concentration, while values of k_{cat} и $K_M^{\text{NAD}^+}$ increased and decreased significantly. The highest positive effect achieved in the case of quaternary buffer NaPB-Cit-Tris-Gly. At 0.05 M concentration of each component k_{cat} increased by 70% compared to one in standard 0.1 M NaPB. At 0.1 M of each component improvement of both parameters, k_{cat} and $K_M^{\text{NAD}^+}$, was observed. Thermal inactivation studies in NaPB and complex NaPB-Cit-Tris-Gly buffer showed that at component concentrations 0.1 M and more SauFDH thermal stability increased. Value of stabilization effect depends on ion strength but not on type of buffer. Comparison of X-ray structures of holo-forms of SauFDH and FDH from bacterium *Pseudomonas* sp.101 shows that active site of PseFDH in complex with substrate is totally closed, while in holo-SauFDH amino acid residues in active site can be accessed by water molecules and buffer components. It could be the reason of k_{cat} и $K_M^{\text{NAD}^+}$ changes in in buffers of different compositions.

Keywords: NAD^+ -dependent formate dehydrogenase, complex buffer systems, catalytic activity, thermal stability

Financial Support. The research was carried out with partial financial support of the Russian Foundation for Basic Research within the framework of scientific project No. 20-04-00915.

For citation: Yurchenko T.S., Bolotova S.B., Loginova A.A., Pometun E.V., Savin S.S., Pometun A.A., Tishkov V.I. Influence of the Components of Buffer Solution on the Catalytic Activity of the NAD⁺-Dependent Formate Dehydrogenase from the Bacterium *Staphylococcus aureus* // Vestn. Mosk. un-ta. Ser. 2. Chemistry. T. 63. N 6. S. 405–417.

Введение

NAD⁺-зависимая форматдегидрогеназа (КФ 1.2.1.2, ФДГ) широко распространена в различных организмах: бактериях, дрожжах, микроскопических грибах и растениях. В природе этот фермент отвечает за снабжение клетки энергией. Помимо важной биологической роли ФДГ представляет большой практический интерес. Она используется в качестве фермента, катализирующего реакцию регенерации кофермента NAD(P)H в биокаталитических процессах синтеза оптически активных соединений с участием оксидоредуктаз [1, 2]. Преимуществами использования ФДГ по сравнению с другими ферментами для регенерации NAD(P)H является практическая необратимость катализируемой этим ферментом реакции, широкий pH-оптимум активности, абсолютная субстратная специфичность, а также низкая стоимость и инертность второго субстрата – формиат-иона. Кроме NAD(P)H вторым продуктом реакции является углекислый газ [3], что позволяет не проводить дополнительную очистку полученного продукта от продуктов сопряженной реакции.

Объектом настоящего исследования является ФДГ из патогенных бактерий *Staphylococcus aureus* (SauФДГ). Преимущества ФДГ из *S. aureus* заключаются в высокой температурной стабильности и самой высокой активности среди всех описанных форматдегидрогеназ [4]. К недостаткам фермента можно отнести высокие значения констант Михаэлиса как по формиату, так и по NAD⁺. Вследствие этого каталитическая эффективность SauФДГ сопоставима со значениями, полученными для форматдегидрогеназ из других источников. На каталитическую эффективность ферментов могут оказывать влияние такие факторы, как значения ионной силы и pH среды, температура и природа компонентов буферного раствора, которые могут влиять на структуру и конформацию всей белковой глобулы и активного центра в частности. Потенциальное влияние условий и среды следует учитывать при измерении каталитических параметров в широком диапазоне pH в разных буферных системах.

Некоторые буферные растворы могут приводить к занижению или завышению констант Михаэлиса, что может быть ошибочно связано с изменением pH. В подобных случаях возникает необходимость использования буферных растворов, охватывающих диапазон в 5 и более единиц pH. Это может быть обеспечено использованием комбинированных систем, которые представляют собой смесь буферных растворов, удовлетворяющих требуемому диапазону pH [5]. Настоящее исследование посвящено изучению влияния природы буферного раствора и концентрации отдельных компонентов на каталитическую активность форматдегидрогеназы из *S. aureus*.

Экспериментальная часть

Экспрессия SauФДГ

Экспрессию SauФДГ проводили в клетках *E. coli* BL21(DE3) CodonPlus/pLysS по ранее описанной методике [4]. Клетки трансформировали плазмидой pSauFDH1 и выращивали в течение ночи при 37 °C на чашках Петри с твердой питательной средой 2YT (16 г/л бактотриптон, 10 г/л дрожжевой экстракт, 1,2% агар, pH 7,0), содержащей 100 мкг/мл ампициллина и 25 мкг/мл хлорамфеникола. Индивидуальные колонии переносили в пробирки с 4 мл среды 2YT, содержащей хлорамфеникол и ампициллин (25 и 100 мкг/мл соответственно). Клетки культивировали при 30 °C и 180 об/мин до поглощения на 600 нм $A_{600} = 1,0–1,2$. Затем клетки переносили в колбы объемом 250 мл с 25 мл среды 2YT (разбавление 1:1000) и культивировали при 30 °C и 120 об/мин до достижения величины $A_{600} = 0,6–0,8$. Полученный инокулят количественно переносили в колбы объемом 1 л с 225 мл среды 2YT без антибиотиков и культивировали при 30 °C и 90 об/мин (разбавление 1:10). По достижении поглощения $A_{600} = 0,6–0,8$ проводили индукцию экспрессии добавлением раствора IPTG до концентрации 1 мМ. Клетки культивировали в течение ночи при 20 °C и 120 об/мин. Биомассу собирали на центрифуге

«Eppendorf 5403» (30 мин, 6000 об/мин, +4 °С). Клетки ресуспендировали в 0,1 М натрий-фосфатном буферном растворе, рН 7,0 (концентрация 20 мас.%) Полученную суспензию хранили при –20 °С.

Очистка SauФДГ

Выделение и очистку фермента осуществляли по стандартной методике, описанной в работе [4]. Суспензия клеток в 0,1 М натрий-фосфатном буферном растворе (рН 7,0) была обработана ультразвуком при +4 °С. Клеточный дебрис удаляли центрифугированием, а к супернатанту добавляли твердый сульфат аммония до концентрации 40% от насыщения с последующей инкубацией в течение ночи при +4 °С. Осадок отделяли центрифугированием, а содержание сульфата аммония в надосадочной жидкости доводили до 90% от насыщения. Полученный раствор инкубировали в течение 4 ч при +4 °С. Супернатант отделяли центрифугированием, а осадок растворяли в 1,8 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ в 0,1 М натрий-фосфатном буферном растворе (рН 7,0) (буфер А). Нерастворившиеся белки были отделены центрифугированием, полученный раствор наносили на колонку 1×10 см с Phenyl-Sepharose Fast Flow («Pharmacia Biotech», Швеция), уравновешенной раствором А. Колонку промывали раствором А до исчезновения поглощения на 280 нм. SauФДГ элюировали с использованием линейного градиента 1,8–0,0 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ в 0,1 М натрий-фосфатном буферном растворе (рН 7,0) (общий объем градиента 150 мл). Собирали фракции по 5 мл, измеряли поглощение на 280 нм (A_{280}) и ферментативную активность (A). Фракции с наибольшим отношением A/A_{280} собирали, концентрировали и обессоливали гель-фильтрацией через колонку «Sephadex G-25 Fine» («Pharmacia Biotech», Швеция). Концентрирование осуществляли с помощью центрифужных концентраторов «Amicon Ultra-15» («Millipore», США). Степень очистки препаратов анализировали с помощью ПААГ-электрофореза (концентрация геля 12%) в денатурирующих условиях в присутствии 0,1% додецилсульфата натрия. Препараты ферментов хранили при +4 °С в 0,1 М натрий-фосфатном буферном растворе (рН 7,0).

Кинетический анализ

Активность ФДГ определяли в различных буферных системах при 30 °С по увеличению поглощения продукта реакции NADH при 340 нм ($\epsilon_{340} = 6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) с использованием спектрофотометра «Shimadzu UV 1800PC». Точные кон-

центрации исходных растворов NAD^+ определяли спектрофотометрически на длине волны 260 нм ($\epsilon_{260} = 17800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Для определения значений V_m и K_M исследовали зависимость скорости реакции от концентрации варьируемого субстрата (0,3–6,0 K_M) при постоянной насыщающей концентрации второго субстрата ($\geq 20 K_M$). Каждое измерение проводили в трех повторах. Численные значения максимальной скорости и констант Михаэлиса получали анализом экспериментальных зависимостей методом нелинейной регрессии (Origin Pro 8.5).

Определение концентрации белка

Концентрацию фермента определяли методом Брэдфорда по абсорбции комплекса с Кумасси при 595 нм с использованием спектрофотометра «Shimadzu UV 1800PC» [6]. Использовали серию стандартов с концентрацией бычьего сывороточного альбумина (БСА) 0,001–0,020 мг/мл.

Определение констант скорости термоинактивации

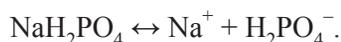
Температурную стабильность SauФДГ изучали по кинетике инактивации в 0,1 М натрий-фосфатном буферном растворе (рН 7,0) и 0,1 М NaPB-Cit-Tris-Gly (рН 7,0) при 64 °С. Для каждого эксперимента готовили серию пробирок Eppendorf (0,5 мл) с 70 мкл раствора фермента (0,2 мг/мл). Пробирки инкубировали в водном термостате (точность термостатирования $\pm 0,1$ градуса). Через фиксированные интервалы времени отбирали одну пробирку и помещали ее в лед на 1 мин. Затем раствор центрифугировали 1 мин при 12 000 об/мин на центрифуге «Eppendorf 5430» и измеряли остаточную активность. Значение константы скорости термоинактивации k_{in} рассчитывали как тангенс угла наклона прямой из графика зависимости натурального логарифма величины остаточной активности от времени в полулогарифмических координатах ($\ln(A/A_0) - t$) методом линейной регрессии (Origin Pro 8.5).

Результаты экспериментов

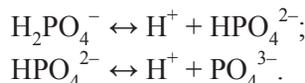
Расчет концентраций отдельных компонентов и ионной силы буферных растворов

Для расчета ионной силы раствора использовали выражения для нахождения равновесной концентрации ионов, присутствующих в растворах. Для этого вначале записывали уравнения кислотно-основных равновесий, которые могут установиться в растворе при добавлении NaH_2PO_4 ,

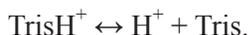
трис(гидроксиметил)аминометана, лимонной кислоты и глицина:



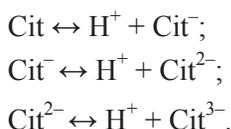
Равновесие в этой системе в анализируемом диапазоне pH частично смещено в сторону процесса диссоциации на ионы:



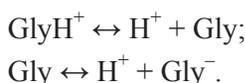
Равновесия в растворе трис(гидроксиметил)аминометана:



Равновесия в растворе лимонной кислоты:



Равновесия в растворе глицина:



На рис. 1 представлены структурные формулы возможных компонентов комбинированных буферных систем с учетом установившихся равновесных состояний.

Выражения для констант диссоциации орто-фосфорной кислоты по второй и третьей ступеням имеют следующий вид:

$$K_{\alpha_2} = \frac{[\text{H}^+][\text{HPO}_4^{2-}]}{[\text{H}_2\text{PO}_4^-]},$$

$$K_{\alpha_3} = \frac{[\text{H}^+][\text{PO}_4^{3-}]}{[\text{HPO}_4^{2-}]}.$$

Выражение для константы диссоциации трис(гидроксиметил)аминометана:

$$K_{\alpha} = \frac{[\text{H}^+][\text{Tris}]}{[\text{TrisH}^]}.$$

Выражения для констант диссоциации лимонной кислоты по трем ступеням:

$$K_{\alpha_1} = \frac{[\text{H}^+][\text{Cit}^-]}{[\text{Cit}]},$$

$$K_{\alpha_2} = \frac{[\text{H}^+][\text{Cit}^{2-}]}{[\text{Cit}^-]},$$

$$K_{\alpha_3} = \frac{[\text{H}^+][\text{Cit}^{3-}]}{[\text{Cit}^{2-}]}.$$

Выражения для констант диссоциации глицина по обоим ступеням:

$$K_{\alpha_1} = \frac{[\text{H}^+][\text{Gly}]}{[\text{Gly}^]},$$

$$K_{\alpha_2} = \frac{[\text{H}^+][\text{Gly}^-]}{[\text{Gly}]}.$$

Далее запишем выражение материального баланса для соответствующих компонентов:

$$\begin{aligned} c_0(\text{NaH}_2\text{PO}_4) &= [\text{H}_2\text{PO}_4^-] + [\text{HPO}_4^{2-}] + [\text{PO}_4^{3-}], \\ c_0(\text{Tris}) &= [\text{TrisH}^+] + [\text{Tris}], \\ c_0(\text{Cit}) &= [\text{Cit}] + [\text{Cit}^-] + [\text{Cit}^{2-}] + [\text{Cit}^{3-}], \\ c_0(\text{Gly}) &= [\text{Gly}^+] + [\text{Gly}] + [\text{Gly}^-]. \end{aligned}$$

Таким образом, равновесные концентрации ионов в растворах могут быть рассчитаны по следующим формулам:

$$[\text{PO}_4^{3-}] = \frac{c_0(\text{NaH}_2\text{PO}_4)}{\frac{[\text{H}^+]^2}{K_{\alpha_2} K_{\alpha_3}} + \frac{[\text{H}^+]}{K_{\alpha_3}} + 1},$$

$$[\text{HPO}_4^{2-}] = \frac{\frac{[\text{H}^+]^2}{K_{\alpha_3}} c_0(\text{NaH}_2\text{PO}_4)}{\frac{[\text{H}^+]^2}{K_{\alpha_2} K_{\alpha_3}} + \frac{[\text{H}^+]}{K_{\alpha_3}} + 1},$$

$$[\text{HPO}_4^-] = \frac{\frac{[\text{H}^+]}{K_{\alpha_2} K_{\alpha_3}} c_0(\text{NaH}_2\text{PO}_4)}{\frac{[\text{H}^+]^2}{K_{\alpha_2} K_{\alpha_3}} + \frac{[\text{H}^+]}{K_{\alpha_3}} + 1},$$

$$[\text{Tris}] = \frac{c_0(\text{Tris})}{\frac{[\text{H}^+]}{K_{\alpha}} + 1},$$

$$[\text{TrisH}^+] = \frac{\frac{[\text{H}^+]}{K_{\alpha}} c_0(\text{Tris})}{\frac{[\text{H}^+]}{K_{\alpha}} + 1},$$

$$[\text{Cit}^{3-}] = \frac{c_0(\text{Cit})}{\frac{[\text{H}^+]^3}{K_{\alpha_1}K_{\alpha_2}K_{\alpha_3}} + \frac{[\text{H}^+]^2}{K_{\alpha_2}K_{\alpha_3}} + \frac{[\text{H}^+]}{K_{\alpha_3}} + 1},$$

$$[\text{Cit}^{2-}] = \frac{\frac{[\text{H}^+]}{K_{\alpha_3}} c_0(\text{Cit})}{\frac{[\text{H}^+]^2}{K_{\alpha_2}K_{\alpha_3}} + \frac{[\text{H}^+]}{K_{\alpha_3}} + 1},$$

$$[\text{Cit}^-] = \frac{\frac{[\text{H}^+]^2}{K_{\alpha_2}K_{\alpha_3}} c_0(\text{Cit})}{\frac{[\text{H}^+]^2}{K_{\alpha_2}K_{\alpha_3}} + \frac{[\text{H}^+]}{K_{\alpha_3}} + 1},$$

$$[\text{Cit}] = \frac{\frac{[\text{H}^+]^3}{K_{\alpha_1}K_{\alpha_2}K_{\alpha_3}} c_0(\text{Cit})}{\frac{[\text{H}^+]^3}{K_{\alpha_1}K_{\alpha_2}K_{\alpha_3}} + \frac{[\text{H}^+]^2}{K_{\alpha_2}K_{\alpha_3}} + \frac{[\text{H}^+]}{K_{\alpha_3}} + 1},$$

$$[\text{Gly}^-] = \frac{c_0(\text{Gly})}{\frac{[\text{H}^+]^2}{K_{\alpha_1}K_{\alpha_2}} + \frac{[\text{H}^+]}{K_{\alpha_2}} + 1},$$

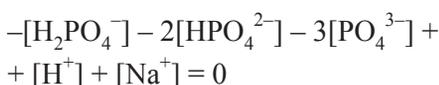
$$[\text{Gly}] = \frac{\frac{[\text{H}^+]}{K_{\alpha_2}} c_0(\text{Gly})}{\frac{[\text{H}^+]^2}{K_{\alpha_1}K_{\alpha_2}} + \frac{[\text{H}^+]}{K_{\alpha_2}} + 1},$$

$$[\text{Gly}^+] = \frac{\frac{[\text{H}^+]^2}{K_{\alpha_1}K_{\alpha_2}} c_0(\text{Gly})}{\frac{[\text{H}^+]^2}{K_{\alpha_1}K_{\alpha_2}} + \frac{[\text{H}^+]}{K_{\alpha_2}} + 1},$$

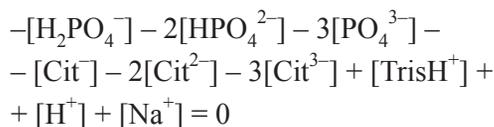
Для расчетов равновесных концентраций используем значения равновесных констант, представленных в табл. 1.

Запишем уравнения электронного баланса для различных буферных растворов:

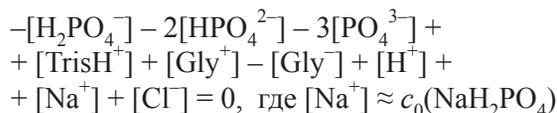
0,05 М – 0,4 М NaPB



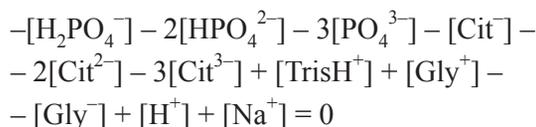
0,1 М NaPB-Cit-Tris



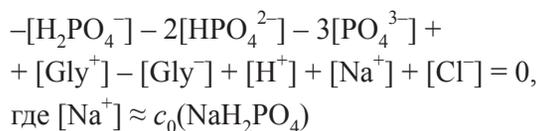
0,1 М NaPB-Gly-Tris и 0,1 М NaPB + 0,25 М Gly-Tris



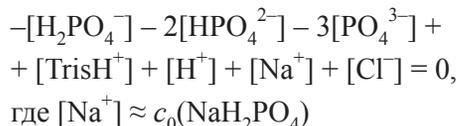
0,025–0,100 М NaPB-Cit-Tris-Gly



0,1 М NaPB+0,5 М Gly



0,1 М NaPB+0,5 М Tris



Ионную силу растворов рассчитываем по формуле:

$$I = 0,5 \sum [A_i] z_i^2,$$

где $[A_i]$ – равновесные концентрации всех присутствующих в растворе ионов, z_i – заряды ионов. Равновесные концентрации компонентов рассчитывали по вышеприведенным формулам с использованием значений pK_{α} , представленным в табл. 1.

Влияние природы буферного раствора на каталитические параметры

Фосфатный буфер является стандартным при определении каталитических параметров формиадегидрогеназ из разных источников [2]. Для исследования возможного влияния различных компонентов наиболее часто используемых буферных систем (Gly, цитрат и Tris) нами на основе фосфатного буфера были приготовлены буферные растворы с двумя, тремя и четырьмя компонентами (табл. 2). Кинетику фермента только на основе Gly, цитрата и Tris и их смесей не изучали, поскольку в чистом виде при pH 7,0 эти соединения не проявляют буферных свойств (см. значения pK_{α} в табл. 1). В табл. 2 представлены значения каталитических кон-

Т а б л и ц а 1

Величины pK_a , использованных для расчета концентраций отдельных компонентов буферных растворов [7]

Компонент буфера	pK_a (25 °C)
H_3PO_4	$pK_{a_1} = 2,15$ $pK_{a_2} = 6,82$ $pK_{a_3} = 12,38$
Трис(гидроксиметил)аминометан	$pK_a = 8,08$
Глицин	$pK_{a_1} = 2,35$ $pK_{a_2} = 9,78$
Лимонная кислота	$pK_{a_1} = 3,13$ $pK_{a_2} = 4,76$ $pK_{a_3} = 6,40$

Т а б л и ц а 2

Каталитические параметры рекомбинантной SauFDH в различных буферных системах (pH 7,0; T = 30 °C)

Буферный раствор	I, M	$K_M^{NAD^+}$, мкМ	k_{cat} , с ⁻¹	$k_{cat}/K_M^{NAD^+}$, мкМ ⁻¹ ·с ⁻¹
0,05 M NaPB	0,088	223±15	15	0,099
0,1 M NaPB	0,177	220±17	20	0,093
0,4 M NaPB	0,706	300±50	21	0,062
0,1 M NaPB+0,5 M Gly	0,638	604±72	20	0,033
0,1 M NaPB+0,5 M Tris	0,599	397±50	18	0,045
0,1 M NaPB-Tris-Cit	0,765	242±23	15	0,061
0,1 M NaPB-Tris-Gly	0,330	194±13	20	0,102
0,1 M NaPB+0,25M Tris-Gly	0,619	225±15	20	0,089
0,1 M NaPB-Cit-Gly	0,864	332±29	16	0,055
0,025 M NaPB-Cit-Tris-Gly	0,216	285±30	14	0,050
0,05 M NaPB-Cit-Tris-Gly	0,432	210±20	34	0,160
0,1 M NaPB-Cit-Tris-Gly	0,864	143±6	27	0,189

* Среднее значение из трех экспериментов (ошибка определения не более 10%).

стант и констант Михаэлиса по NAD^+ ($K_M^{NAD^+}$) для SauFDH в различных буферных системах. Величина константы Михаэлиса по формиату в исследованных буферах не изменялась, поэтому значения $K_M^{HCOO^-}$ не приведены. Из табл. 2 видно, что как состав буфера, так и его концентрация (общая и отдельных компонентов) оказывают заметное влияние на k_{cat} и $K_M^{NAD^+}$. В случае натрий-фосфатного буфера увели-

чение концентрации раствора от 0,05 до 0,10 M приводит к увеличению k_{cat} на 25% при неизменном значении $K_M^{NAD^+}$. Дальнейшее увеличение концентрации буфера до 0,4 M оказывает противоположный эффект – каталитическая константа остается постоянной, а величина константы Михаэлиса по NAD^+ возрастает (ухудшается) более чем на 35%. Это можно было бы объяснить увеличением ионной силы раствора, однако

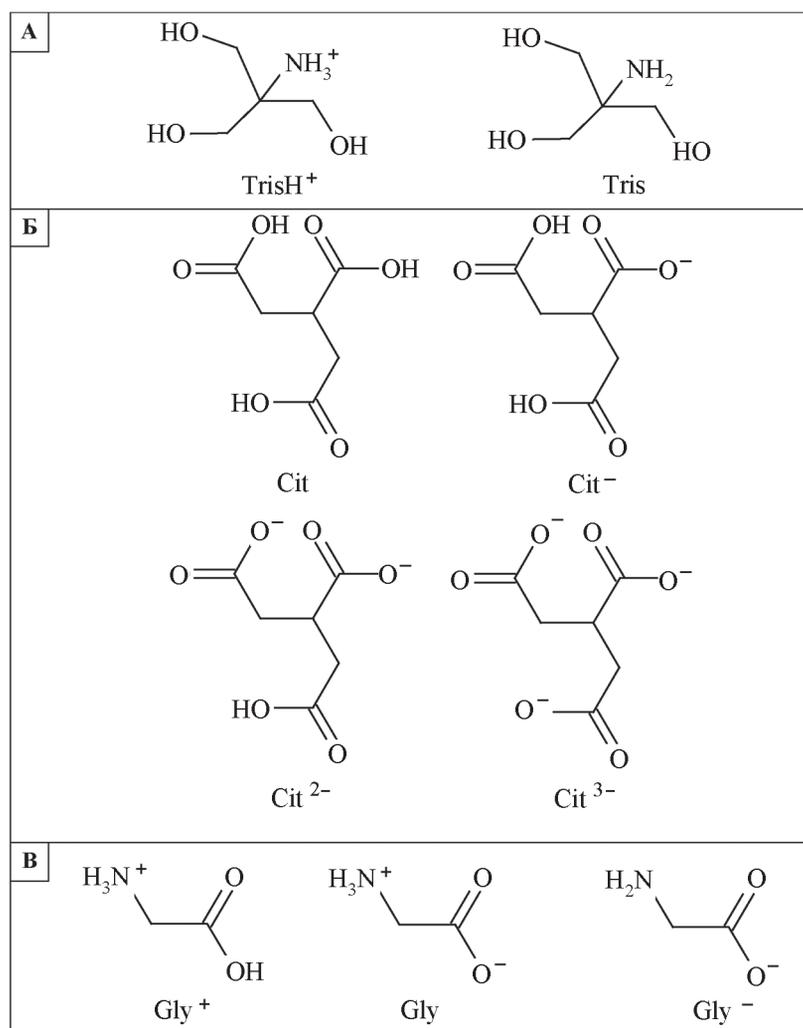


Рис. 1. Структуры возможных форм компонентов буферных систем: А – трис(гидроксиметил)аминометан, Б – лимонная кислота, В – глицин

значения k_{cat} и $K_{\text{M}}^{\text{NAD}^+}$ в 0,1 М буфере NaPB-Cit-Tris (высокая ионная сила, $I = 0,765$) совпадают с таковыми величинами для 0,05 М фосфатного буфера с низкой ионной силой ($I = 0,088$). В целом, введение в буфер дополнительных компонентов, таких как Gly, цитрат и Tris приводит к изменению каталитических параметров, однако четких закономерностей не наблюдается. В двойных буферах 0,1 М NaPB + 0,5 М Gly и 0,1 М NaPB + 0,5 М Tris, у которых значения ионной силы близки ($I = 0,638$ и $I = 0,599$ соответственно) наблюдается самое большое увеличение значения константы Михаэлиса по NAD^+ , причем в случае двойного буферного раствора с Gly эффект наиболее сильный. В то же время в тройном буфере 0,1 М NaPB-Tris-Gly со средней ионной силой ($I = 0,330$) величина $K_{\text{M}}^{\text{NAD}^+}$ на 10% меньше таковой в 0,1 М NaPB буфере. Наличие цитрат-иона в двойных

и тройных буферах приводит к уменьшению каталитической константы. Наиболее интересные результаты были получены при использовании четырехкомпонентных буферов. При низкой концентрации каждого из компонентов (0,025 М, $I = 0,216$) наблюдается достоверно большее на 30% значение $K_{\text{M}}^{\text{NAD}^+}$ и уменьшение на ту же величину k_{cat} по сравнению со значениями каталитических параметров для стандартной системы определения кинетических параметров (0,1 М NaPB). Увеличение концентрации каждого из компонентов в два раза до 0,05 М ($I = 0,432$) приводит к восстановлению величины $K_{\text{M}}^{\text{NAD}^+}$ как и в 0,1 М NaPB и к возрастанию каталитической константы до 37 s^{-1} (увеличение на 85%). Дальнейшее повышение концентрации всех компонентов четверного сложного буфера до 0,1 М улучшает константу Михаэлиса по NAD^+ в 1,5 раза и хотя каталитическая кон-

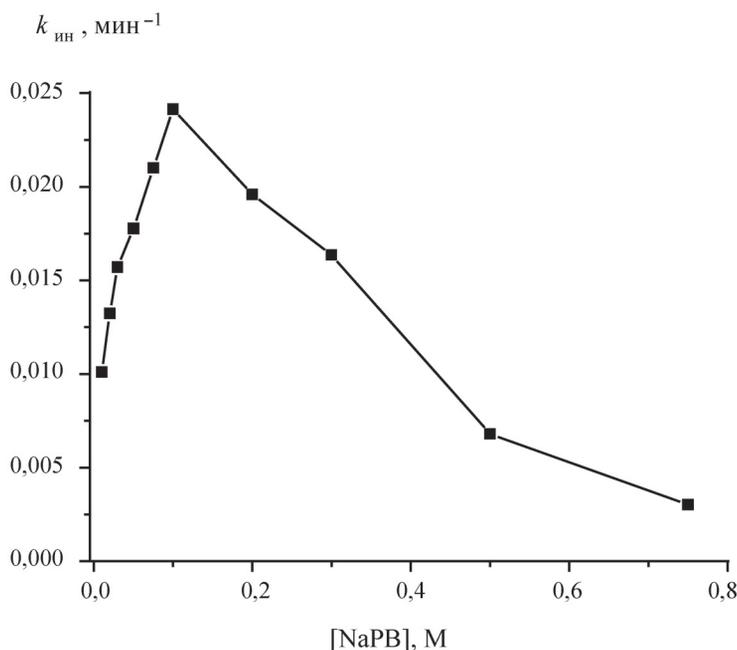


Рис. 2. Зависимость величины константы скорости термоинактивации SauФДГ от концентрации фосфатного буфера (0,01–0,75 М натрий-фосфатный буфер (NaPB); pH 7,0; $T = 64\text{ }^{\circ}\text{C}$)

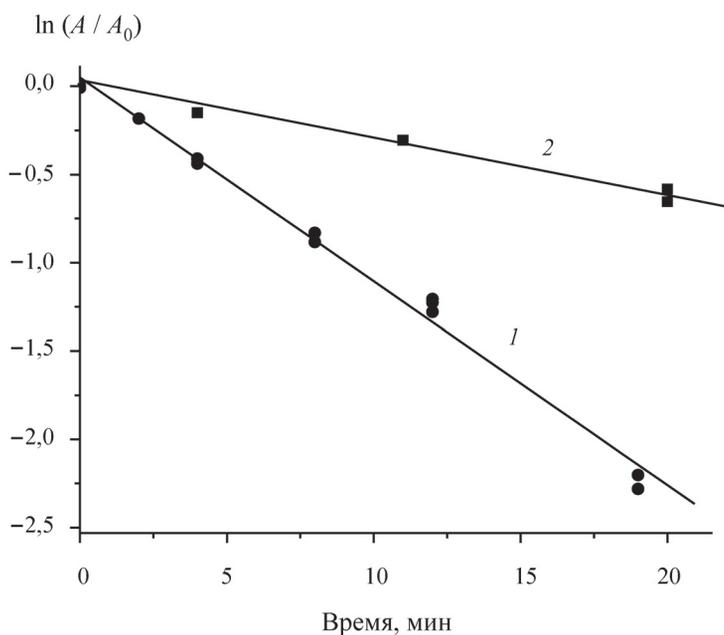


Рис. 3. Зависимость остаточной активности от времени инкубации в полулогарифмических координатах для фермента дикого типа в 0,1 М натрий-фосфатном (1) и 0,1 М NaPB-Cit-Tris-Gly (2) буферных растворах (pH 7,0; $T = 64\text{ }^{\circ}\text{C}$)

станта по сравнению с предыдущим буфером 0,05 М NaPB-Cit-Tris-Gly уменьшается с 34 до 27 с⁻¹, эта величина все равно остается более высокой по сравнению со значением для стандартной системы 20 с⁻¹ (табл. 2).

Влияние природы буферного раствора на температурную стабильность SauФДГ

В дополнение к кинетическим исследованиям мы изучили термостабильность SauФДГ в растворах фосфатного буфера разной концентрации

Т а б л и ц а 3

Сравнение каталитических параметров рекомбинантных ФДГ дикого типа (wt-ФДГ) из бактерий *Pseudomonas* sp.101 и дрожжей *Candida boidinii* и их мутантов с данными для SauФДГ в двух 0,1 М буферных растворах (рН 7,0; $T = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$)

Буферный раствор	Фермент	k_{cat} , с ⁻¹	$K_M^{NAD^+}$, мкМ	$K_M^{HCOO^-}$, мМ	$k_{cat}/K_M^{NAD^+}$, (мкМ·с) ⁻¹	$k_{cat}/K_M^{HCOO^-}$, (мкМ·с) ⁻¹
0,1 М NaPB	wt-PseФДГ [8]	7,3	60±5	6,5±0,2	0,122	1,123
	PseФДГ SM4S [9, 10]	7,3	41±5	3,2±0,2	0,178	2,281
0,1 М NaPB	wt-CboФДГ [11]	3,7	35±3	5,9±0,4	0,106	0,627
	Mut-CboФДГ* [9, 12]	6,1	73±3	14±0,4	0,084	0,436
	SauФДГ**	20	220±10	130±10	0,091	0,154
0,05 М NaPB-Cit-Tris-Gly	SauФДГ**	34	210±20	124±6	0,162	0,211
0,1 М NaPB-Cit-Tris-Gly	SauФДГ**	27	143±6	128±6	0,189	0,274

* Mut-CboФДГ – CboФДГ с заменами Cys23Ser/Phe285Ser.

** Настоящая работа.

(рис. 2), а также сравнили термостабильность в стандартном 0,1 М фосфатном буфере и в 0,1 М комплексном буфере NaPB-Cit-Tris-Gly, в котором фермент имеет оптимальные каталитические параметры (рис. 3). В обоих случаях термоинактивация фермента протекает по мономолекулярному механизму, поэтому в качестве меры термостабильности фермента при этих условиях можно использовать значение наблюдаемой константы скорости термоинактивации первого порядка. В случае фосфатного буфера разной концентрации зависимость наблюдаемой константы скорости термоинактивации имеет колокообразный вид с максимумом при концентрации 0,1 М (рис. 2). Данные этого рисунка хорошо согласуются с результатами кинетических экспериментов о влиянии концентрации буфера на свойства SauФДГ. Этот же факт подтверждается и влиянием комплексного буфера на термостабильность (рис. 3). Как следует из рис. 3, использование комбинированной буферной системы не только улучшает кинетические параметры фермента, но и приводит к повышению термостабильности (снижению константы скорости термоинактивации) в 3,8 раза. Однако следует отметить, что более высокая стабильность SauФДГ в 0,1 М комплексном буфере NaPB-Cit-Tris-Gly ($I = 0,864$) по сравнению с 0,1 М NaPB не является специфическим эффектом присутствия органических соединений, поскольку в натрий-фосфатном буфере

с такой же высокой ионной силой (0,48 М) константа скорости термоинактивации также примерно в 3,6–3,8 раза меньше, чем таковая при концентрации 0,1 М (рис. 2).

Обсуждение результатов

Результаты проведенных экспериментов однозначно свидетельствуют о влиянии концентрации и состава используемого буферного раствора на каталитические параметры SauФДГ, однако выявить какие-либо закономерности не представляется возможным. Тем не менее, использование комплексного буферного раствора, в который входят фосфат натрия, цитрат, трис и глицин позволяет существенно повысить каталитическую эффективность фермента с NAD^+ (табл. 2, 3). В табл. 3 для сравнения приведены кинетические параметры и эффективности наиболее хорошо изученных и наиболее часто используемых на практике формиадегидрогеназ – рекомбинантных ФДГ дикого типа (wt-ФДГ) из бактерий *Pseudomonas* sp.101 и дрожжей *Candida boidinii*, а также их лучших на данный момент мутантов PseФДГ SM4S [9,10] и CboФДГ C23S/F285S [8, 12]. Из табл. 3 видно, что в 0,1 М комплексном буфере каталитическая эффективность SauФДГ с NAD^+ ($k_{cat}/K_M^{NAD^+}$) немного превосходит таковую для PseФДГ SM4S (189 и 178 мМ⁻¹·с⁻¹ соответственно), однако по каталитической эффективности с формиадом SauФДГ пока значительно (в 10,8 раза) уступает PseФДГ SM4S

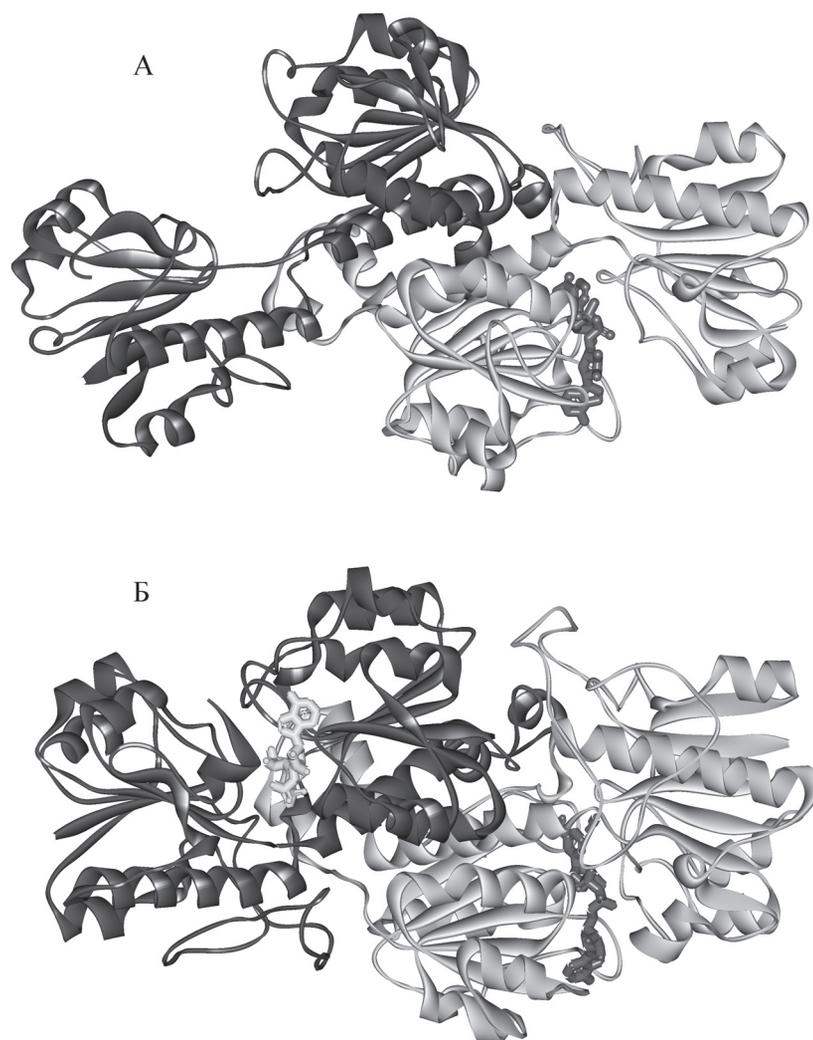


Рис. 4. Структуры холо-форм SauФДГ (А) и ФДГ из бактерий *Pseudomonas* sp.101 (Б). Для построения использовали структуры PDB 6TTB и PDB 2NAD соответственно

(табл. 3). Однако в условиях насыщающих концентраций обоих субстратов для проведения процесса следует использовать SauФДГ в 0,05 М комплексе буфера NaPB-Cit-Tris-Gly, поскольку в этих условиях активность SauФДГ в 4,66 раза выше, чем активность ФДГ из бактерий *Pseudomonas* sp.101. Следует также отметить, что в условиях насыщения по концентрации формиата (0,6 М) общая величина ионной силы в 0,05 М комплексом буфера NaPB-Cit-Tris-Gly составляет $I = 1,032$.

Улучшение каталитических параметров SauФДГ в комбинированном буфере NaPB-Cit-Tris-Gly может быть обусловлено как взаимодействием компонентов буфера с определенными участками всей белковой глобулы, так и специфическим взаимодействием с аминокислотными остатками в активном центре. Наиболее перспективной представляется вторая гипотеза, поскольку при взаимодействии отдельных ком-

понентов буфера с участками белковой глобулы должна меняться температурная стабильность. Однако данные по термоинактивации свидетельствуют, что повышение термостабильности связано просто с повышением ионной силы раствора (рис. 2, 3). В пользу специфических взаимодействий в активном центре свидетельствуют результаты сравнения структуры SauФДГ в комплексе с NAD^+ (PDB 6TTB) и холо-формы PseФДГ (PDB 2NAD) (рис. 4, А, Б). В известных ФДГ в свободной форме активный центр фермента представляет большую полость, в которой находятся молекулы воды и компоненты буфера. При образовании комплекса с субстратами (переход в холо-форму) активный центр фермента закрывается с удалением из него молекул растворителя и компонентов буфера. Закрытая конформация активного центра очень хорошо видна в структуре холо-формы ФДГ из *Pseudomonas*

sp.101 (рис. 4, Б). Из рис. 4, Б следует, что молекула кофермента находится внутри «закрытого» активного центра. Доступной растворителю остается только аминогруппа при С6-атоме углерода аденозина. В структуре PDB 6TTV (получена при кристаллизации SauФДГ с NAD^+) [4] левая субъединица соответствует апо-форме – в ней нет связанного кофермента и активный центр находится в открытой конформации, а правая субъединица соответствует холо-форме, поскольку в ее активном центре находится молекула NAD^+ (рис. 4, А), однако этот активный центр не является полностью закры-

тым, как это реализовано в холо-форме PseФДГ (рис. 4, Б). «Неполное закрытие» активного центра SauФДГ при связывании с NAD^+ означает, что молекулы растворителя и компоненты буфера могут находиться в активном центре холо-формы и оказывать влияние на эффективность связывания кофермента. Отсутствие влияния использованных в комплексных буферах соединений на константу Михаэлиса по формиату, вероятно, связано с тем, что их размеры намного больше размеров формиат-иона и поэтому они просто не могут проникать к участку связывания этого субстрата.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hummel W., Kula M.R. // *Eur. J. Biochem.* 1989. Vol. 184. N 1. P. 1–13 (DOI: 10.1111/j.1432-1033.1989.tb14983.x).
- Tishkov, V.I., Popov, V.O. // *Biochemistry (Moscow)* 2004. Vol. 69. N 11. P. 1252–1267 (DOI: 10.1007/s10541-005-0071-x).
- Tishkov, V.I., Popov, V.O., Egorov, A.M. // *Bioorganicheskaya Khimia (USSR)*. 1982. Vol. 8. N 10. P. 1327–1331.
- Pometun A.A., Boyko K.M., Yurchenko T.S., Nikolaeva A.Yu., Atroshenko D.L., Savin S.S., Popov V.O., Tishkov V.I. // *Biochemistry (Moscow)*. 2020. Vol. 85. N 6. P. 689–696.
- Ellis K.J., Morrison J.F. // *Methods in Enzymology*. 1982. Vol. 87. N 23. P. 405–426.
- Bradford M.M. // *Anal. Biochem.* 1976. Vol. 72. P. 248–254.
- Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. // *Справочник биохимика*. М., 1991. С. 351–353 (Dawson R.M.C., Elliott D.C., Elliott W.H., Jones K.M. // Oxford, 1986).
- Tishkov V.I., Popov V.O. // *Biomol. Eng.* 2006. Vol. 23. N 2–3. P. 89–110.
- Tishkov V.I., Goncharenko K.V., Alekseeva A.A., Klyemenov S.Yu., Savin S.S. // *Biochemistry (Moscow)*. 2015. Vol. 80. N 13. P. 1690–1700.
- Pometun A.A., Parshin P.D., Galanicheva N.P., Shaposhnikov L.A., Atroshenko D.L., Pometun E.V., Burmakin V.V., Klyemenov S.Yu., Savin S.S., Tishkov V.I. // *Acta Naturae*. 2022. Vol. 14. N 1(52). P. 82–91.
- Slusarczyk H., Felber S., Kula M. R., Pohl M. // *Eur. J. Biochem.* 2000. Vol. 267 N 5 P. 1280–1289 (DOI: 10.1046/j.1432-1327.2000.01123.x).
- Felber, S. Optimierung der NAD^+ -abhaengigen Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii* fuer den Einsatz in der Biokatalyse. Ph.D. Thesis. Heinrich-Heine University of Duesseldorf. 2001 (URL: <http://diss.uni-duesseldorf.de/ebib/diss/file?dissid=78>).

Информация об авторах

Юрченко Татьяна Сергеевна – аспирант кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, yurchenko.ts.chem@gmail.com;

Болотова Сэсэг Баторовна – студентка химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, seseg.bolotova@gmail.com;

Логонова Анастасия Аркадьевна – студентка химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, loginovaa.anast@gmail.com;

Пометун Евгений Владимирович – доцент кафедры аналитической, физической и коллоидной химии Института фармации ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), канд. хим. наук, epometun@gmail.com;

Савин Святослав Сергеевич – ст. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, канд. биол. наук, savinslava@gmail.com;

Пометун Анастасия Александровна – ст. науч. сотр. лаборатории молекулярной инженерии Института биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский

центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, ст. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, докт. хим. наук, aarometun@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; докт. хим. наук, профессор, vitishkov@gmail.com.

Вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила в редакцию 04.05.2022;
одобрена после рецензирования 14.05.2022;
принята к публикации 16.05.2022.