



УДК 577.152.121\*2.02

ХИМИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ КАРБОКСИЛЬНЫХ ГРУПП  
БАКТЕРИАЛЬНОЙ ФОРМИАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ

Тиников В. И., Егоров А. М.

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,  
кафедра химической энзимологии

Цопов В. О.

Институт биохимии им. А. Н. Баха Академии наук СССР, Москва

Модификация карбоксильных групп в молекуле формиатдегидрогеназы метилотрофных бактерий *Achromobacter parvulus* T1 N-этил-5-фенилизоксазол-3'-сульфокислотой (реагентом Вудварда К) приводит к полной инактивации фермента. Изучено влияние концентраций модифицирующего агента, рН среды, коферментов и некоторых других веществ на скорость инактивации. Показано, что реакция формиатдегидрогеназы с реагентом Вудварда К протекает в две стадии: 1) обратимое образование двойного комплекса фермент-модификатор и 2) модификация фермента в комплексе. Полная инактивация формиатдегидрогеназы происходит при модификации одной карбоксильной группы на субъединицу фермента. В тех же условиях в присутствии NAD и NADH наблюдается полное сохранение ферментативной активности и осуществляется специфическая защита функционально важной карбоксильной группы от модифицирующего агента. Предполагается, что на NAD-связывающем участке активного центра формиатдегидрогеназы или вблизи него имеется карбоксильная группа, существенная для связывания коферментов.

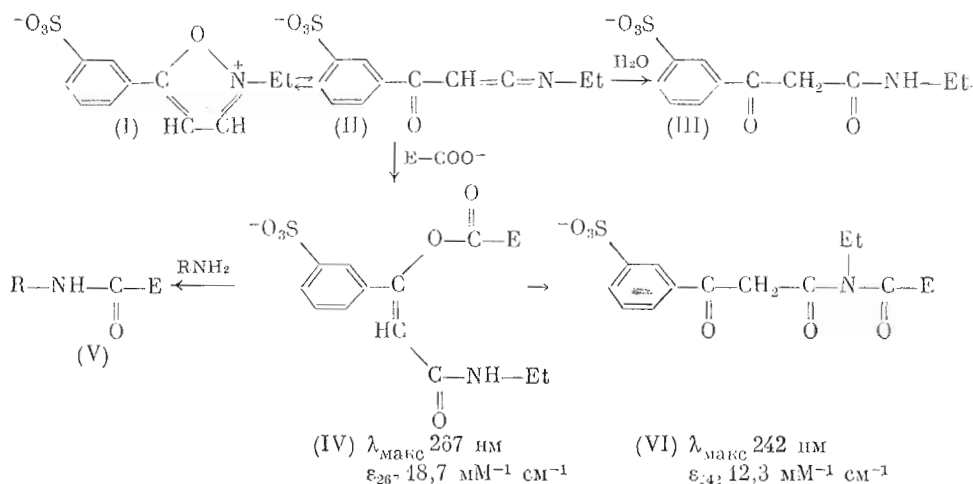
Химическая модификация функциональных групп в белках с помощью специфических реагентов является эффективным методом для выяснения роли этих групп в ферментативном катализе и их локализации на активном центре. Ранее с помощью данного метода нами была исследована роль остатков гистидина [1], цистеина [2], аргинина [3] и лизина [4] в катализе, осуществляемом NAD-зависимой формиатдегидрогеназой (КФ 1.2.1.2) метилотрофных бактерий *Achromobacter parvulus* T1. Было показано, что в активном центре фермента имеется остаток лизина, участвующий в связывании формиат-иона, и остатки цистеина и аргинина, существенные для связывания NAD.

Результаты исследования рН-зависимостей максимальной скорости реакции и величины  $K_m$  формиатдегидрогеназы по NAD [5] свидетельствуют о наличии в активном центре фермента группы с рК меньше 6, существенной для хода ферментативной реакции. Ею может быть карбоксильная группа остатка глутаминовой или аспарагиновой кислоты.

Целью настоящей работы было изучение роли карбоксильных групп в каталитическом действии NAD-зависимой формиатдегидрогеназы метилотрофных бактерий *A. parvulus* T1.

Карбоксильные группы в белках можно модифицировать с помощью диазометана и его производных [6], карбодимидов [7, 8], различных солей изоксазолия [9, 10], в частности N-этил-5-фенилизоксазол-3'-сульфокислоты (реагент Вудварда К) [9, 11]. В случае нашего фермента диазометан использовать нельзя, так как реакцию модификации проводят при рН 4,0 [6], а формиатдегидрогеназа при рН ниже 5,2 быстро инактивируется. Реагент Вудварда К по своему действию аналогичен карбодимиду. Он позволяет селективно модифицировать карбоксильные группы в белках при достаточно высоких значениях рН. Например, модификация карбоксипептидазы А этим реагентом проводилась при рН 6,4 [11]. Кроме того, можно предполагать, что имея собственный положительный заряд, этот модифицирующий агент сорбируется на активном центре формиатдегидрогеназы за счет электростатических взаимодействий и в первую очередь будет модифицировать карбоксильные группы в активном центре.

На рис. 1 в полулогарифмических координатах представлены зависимости падения ферментативной активности во времени в присутствии реагента Вудварда К в различных концентрациях. При избытке модифицирующего агента реакция модификации сопровождается полной инактивацией фермента (кривая 5). Процесс инактивации формиатдегидрогеназы



следует кинетике первого порядка первые 40–50 мин, а затем наблюдается отклонение от первого порядка, что, по-видимому, обусловлено собственным гидролизом модифицирующего агента. Известно, что реагент Вудварда К стабилен при pH 3,0 [11], а при более высоких pH гидролизует [9, 11] с образованием соединения (III) (см. схему). Кинетика инактивации в принципе могла отклоняться от первого порядка вследствие изменения pH реакционной смеси (6,0) в ходе модификации [11]. Однако в нашем случае этого не происходило, потому что эксперименты проводились в присутствии 0,25 М гексаметилендиамина (0,5 н. по аминогруппам), что позволяло поддерживать pH раствора равным 6,0 в ходе реакции с точностью до 0,05 ед. pH.

Гиперболический характер концентрационной зависимости наблюдаемой константы скорости инактивации фермента (рис. 2а) предполагает образование промежуточного комплекса между формиатдегидрогеназой и модифицирующим агентом с последующей инактивацией формиатдегидрогеназы в комплексе [3, 11] согласно схеме



где E и RW — формиатдегидрогеназа и реагент Вудварда К соответственно, E·RW и E—RW — нековалентный и ковалентный комплексы фермента с модифицирующим агентом, K — константа диссоциации комплекса E·RW,  $k_{in}$  — константа скорости инактивации формиатдегидрогеназы в комплексе. Линеаризация наблюдаемой концентрационной зависимости в двойных обратных координатах (рис. 2б) позволяет определить значения K и  $k_{in}$ , которые составляют  $3,0 \pm 0,5 \text{ мМ}$  и  $0,126 \pm 0,017 \text{ мин}^{-1}$  соответственно (pH 6,0; 25° С). Отметим, что в случае модификации карбоксипептидазы А [11] величина K, характеризующая средство положительно заряженной молекулы реагента Вудварда К к активному центру фермента, была почти в 13 раз выше —  $37,7 \pm 1 \text{ мМ}$  (pH 6,4; 25° С), а константа  $k_{in}$ , отражающая непосредственное взаимодействие модификатора с карбоксильной группой в активном центре, — в 17 раз выше —  $2,19 \pm 0,26 \text{ мин}^{-1}$ .

На рис. 3 представлены результаты исследования инактивации формиатдегидрогеназы реагентом Вудварда К в присутствии NAD и NADH. Чтобы исключить эффект кажущейся защиты фермента за счет снижения концентрации модифицирующего агента при его возможном взаимодействии с коферментами, сначала изучали защитный эффект при одинаковых концентрациях NAD и NADH (0,5 мМ). Если уменьшение скорости инак-

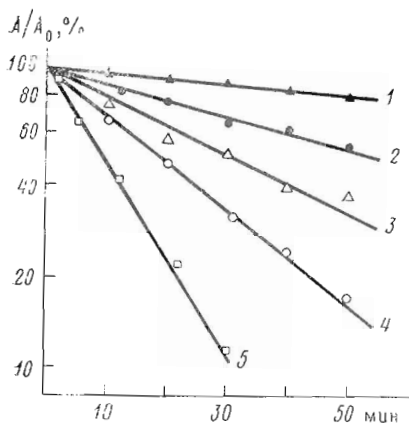


Рис. 1

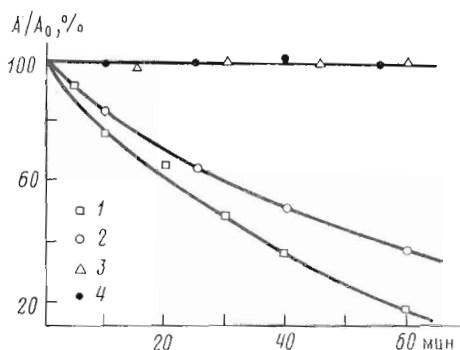


Рис. 3

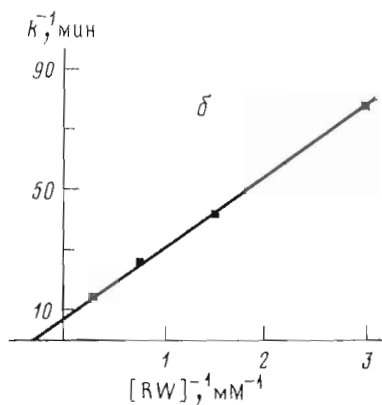
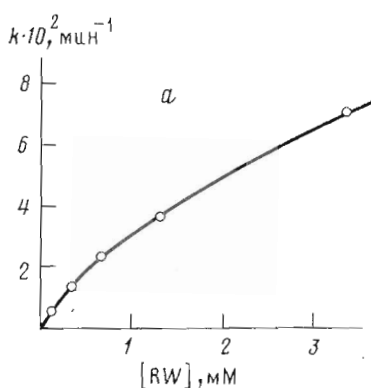


Рис. 2

Рис. 1. Инактивация формиатдегидрогеназы в присутствии реагента Вудварда К в концентрациях (мМ): 0,12 (1), 0,336 (2), 0,67 (3), 1,34 (4), 3,36 (5). [E] 4,5 мкМ; 0,25 М гексаметилендиамин, pH 6,0; 25° С. А — активность

Рис. 2. Зависимость наблюдаемой константы первого порядка скорости инактивации формиатдегидрогеназы от концентрации реагента Вудварда К (а); б — та же зависимость в двойных обратных координатах. 0,25 М гексаметилендиамин, pH 6,0; 25° С

Рис. 3. Инактивация формиатдегидрогеназы реагентом Вудварда К в отсутствие коферментов (1), в присутствии 0,5 (2) и 5 мМ (4) NAD и 0,5 мМ NADH (3). [RW] 0,88 мМ [E] 4,5 мкМ; 0,25 М гексаметилендиамин, pH 6,0; 25° С

тивации формиатдегидрогеназы обусловлено взаимодействием реагента Вудварда К с коферментами, то при равных концентрациях NAD и NADH должны давать одинаковый защитный эффект. Если же снижение наблюдаемой константы скорости инактивации обусловлено связыванием формиатдегидрогеназы в двойной комплекс с NAD или NADH, то при используемых концентрациях коферментов NADH вследствие меньшей константы диссоциации комплекса E — NADH (12 мкМ [12]) должен полностью защищать фермент от инактивации, а NAD ( $K_d$  240 мкМ [12]) — нет. Как видно из рис. 3, NADH (кривая 3) в насыщающей концентрации (0,5 мМ = 42  $K_d$ ) осуществляет полную защиту формиатдегидрогеназы от инактивации реагентом Вудварда К. NAD в той же концентрации, но равной лишь 2  $K_d$ , только частично защищает фермент (кривая 2). Увеличение концентрации NAD до 5 мМ (20  $K_d$ ) приводит к полному сохранению ферментативной активности в ходе реакции модификации. Таким образом, образование двойных комплексов E — NAD и E — NADH обеспечивает полную защиту формиатдегидрогеназы от инактивации реагентом Вудварда К.

Инактивация формиатдегидрогеназы может происходить за счет взаимодействия реагента Вудварда К с существенными амино- или сульф-

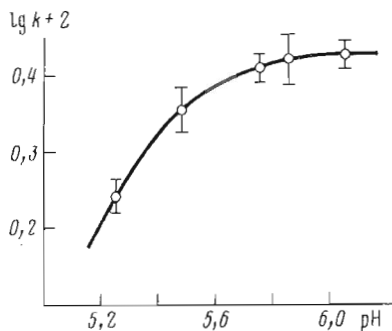


Рис. 4

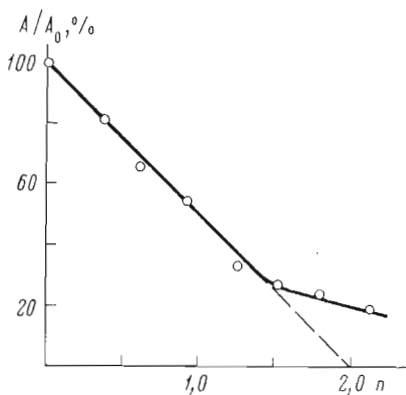


Рис. 6

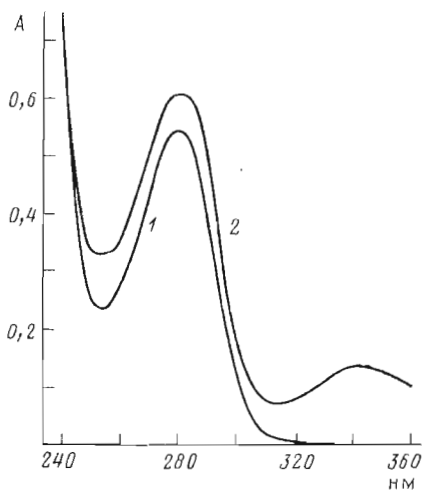


Рис. 5

Рис. 4. Зависимость наблюдаемой константы первого порядка скорости инактивации форматдегидрогеназы реагентом Вудварда К от pH среды. [RW] 0,83 мМ, [E] 4,5 мкМ; 0,25 М гексаметилендиамин, 25° С

Рис. 5. Спектры поглощения нативной (1) ( $\epsilon_{278}$  127 мМ<sup>-1</sup>см<sup>-1</sup>) и модифицированной реагентом Вудварда К (25% исходной активности) (2) ( $\epsilon_{278}$  157 мМ<sup>-1</sup>см<sup>-1</sup>) форматдегидрогеназы. 0,25 М фосфатный буфер, pH 7,0

Рис. 6. Зависимость остаточной активности фермента от числа модифицированных карбоксильных групп на молекулу форматдегидрогеназы (n)

гидрильной группами активного центра фермента. Однако полученные экспериментальные данные указывают на то, что инактивация форматдегидрогеназы связана именно с модификацией карбоксильных групп. Об отсутствии взаимодействия реагента Вудварда К с существенными аминокислотными и сульфгидрильной группами свидетельствует следующее.

1. Ни гексаметилендиамин в концентрациях 5–750 мМ, ни меркаптоэтанол в концентрациях 0,1–10 мМ (максимально 17 000- и 2300-кратные соответственно избытки по отношению к концентрации фермента в инактивационной смеси) на скорость инактивации форматдегидрогеназы реагентом Вудварда К не влияют.

2. NAD и NADH не могут защищать форматдегидрогеназу от инактивации, если модифицируется существенная аминокислотная группа, так как она расположена на формиат-, а не на коферментсвязывающем участке активного центра [4].

3. Обсчет pH-зависимости наблюдаемой константы скорости инактивации фермента (рис. 4) на ЭВМ дает значение рК  $5,20 \pm 0,05$ , которое лежит в диапазоне значений рК, характерных для карбоксильных групп остатков аспарагиновой и глутаминовой кислот в белках. Для существенных аминокислотных и сульфгидрильной групп форматдегидрогеназы рК равны 9,3 и 9,1 соответственно [2, 5].

4. Инактивация форматдегидрогеназы реагентом Вудварда К сопровождается спектральными изменениями, характерными для взаимодействия модифицирующего агента с карбоксильными группами в белках (см. рис. 5 и схему). На первом этапе реакции модификации дол-

жен образовываться виниловый эфир (IV), который имеет максимумы поглощения при 267 нм ( $\epsilon_{267}$  18,7  $\text{мМ}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$ ) [13] и 340 нм [10, 11]. На спектре модифицированной формиатдегидрогеназы (25% исходной активности) действительно имеется широкий максимум в районе 340 нм (рис. 5). Дифференциальная спектроскопия указывает также на наличие в спектре модифицированного фермента максимума при 267 нм (спектр не приведен). Таким образом, на основании полученных данных можно считать, что потеря ферментативной активности при инкубации формиатдегидрогеназы с реагентом Вудварда К обусловлена модификацией карбоксильных групп фермента.

В отсутствие нуклеофильных агентов при pH выше 7,0 должна происходить медленная перегруппировка O-ацилпроизводного (IV) в N-ацилпроизводное (VI) [11] (схема), которая сопровождается появлением максимума при 242 нм [13]. В наших экспериментах (модифицированный фермент после отделения избытка модифицирующего агента гель-фильтрацией находился в 0,05 М фосфатном буфере, pH 7,0) при 25° С такой перегруппировки по крайней мере в течение 6 ч зарегистрировать не удалось. Поэтому спектрофотометрическое определение числа модифицированных карбоксильных групп мы осуществляли по увеличению поглощения при 267 нм, используя коэффициент экстинкции 18,7  $\text{мМ}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$  [13].

На рис. 6 представлена зависимость падения ферментативной активности от числа модифицированных карбоксильных групп. Вплоть до величины 25% исходной активности активность формиатдегидрогеназы линейно падает с ростом числа модифицированных карбоксильных групп. Экстраполяция на нулевые значения остаточной активности показывает, что полная инактивация фермента связана с блокированием двух карбоксильных групп на молекулу или одной карбоксильной группы на субъединицу формиатдегидрогеназы. Следует отметить, что в случае модификации карбоксипептидазы А [11] линейная корреляция между степенью инактивации фермента и числом модифицированных карбоксильных групп сохраняется только до величины 50% исходной активности. Более избирательная модификация существенных карбоксильных групп в молекуле формиатдегидрогеназы при больших глубинах инактивации (>50%), по-видимому, связана с более высоким сродством молекулы модифицирующего агента к активному центру формиатдегидрогеназы, чем к активному центру карбоксипептидазы А (см. выше). При инактивации формиатдегидрогеназы реагентом Вудварда К до величины 25% исходной активности модифицируется 1,6 карбоксильной группы на молекулу фермента. Проведение реакции модификации в тех же условиях, но в присутствии 0,5  $\text{мМ}$  NADH сопровождается полным сохранением ферментативной активности и модификацией только 0,1 карбоксильной группы на молекулу фермента. Таким образом, полная защита формиатдегидрогеназы от инактивации реагентом Вудварда К обусловлена защитой от модификации одной карбоксильной группы на активный центр фермента.

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о наличии в активном центре формиатдегидрогеназы одной карбоксильной группы, существенной для ферментативного катализа. Защита этой карбоксильной группы от модификации коферментом NADH позволяет предположить, что существенный карбоксил расположен на коферментсвязывающем участке активного центра фермента или вблизи него.

В настоящее время отсутствуют данные по химической модификации карбоксильных групп NAD-зависимых дегидрогеназ. Однако для алкогольдегидрогеназы печени лошади методом рентгеноструктурного анализа было показано, что на NAD-связывающем участке активного центра имеется остаток Asp<sup>223</sup> [14]. При сорбции на активный центр алкогольдегидрогеназы NAD(H) карбоксильная группа этого остатка вместе с аминокислотной группой остатка Lys<sup>228</sup> и 2'-ОН-группой рибозы аденозина образуют систему водородных связей. Считается, что образование этой системы водородных связей обеспечивает специфичность алкогольдегидрогеназы по отношению к NAD(H) и плохое связывание фермента с NADP(H) [14]. На основании анализа рентгеноструктурных данных для других NAD-зави-

симых дегидрогеназ также было показано, что наличие карбоксильной группы на коферментсвязывающем домене, образующей водородную связь с 2'-ОН-группой рибозы аденозина, является инвариантным для всех рассмотренных ферментов: алкогольдегидрогеназы, лактатдегидрогеназы, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы, малатдегидрогеназы [15]. Учитывая высокую гомологию в строении коферментсвязывающего домена NAD-зависимых дегидрогеназ [15], можно предполагать, что в случае формиатдегидрогеназы метилотрофных бактерий существенная карбоксильная группа, возможно, выполняет ту же функцию, что и в упомянутых выше ферментах. Для доказательства этого предложения, естественно, требуется проведение дополнительных экспериментов.

### Экспериментальная часть

В работе использовали N-этил-5-фенилизоксазол-3'-сульфокислоту (Sigma, США), NADH (Boehringer, ФРГ), NAD (Reanal, Венгрия), меркаптоэтанол (Koch Light, Англия), отечественные реактивы гексаметилендиамина и формиат натрия (ч.д.а.).

Формиатдегидрогеназу выделяли из метилотрофных бактерий *A. parvulus* T1 как описано ранее [5] в присутствии 0,5 мМ меркаптоэтанола в качестве стабилизатора ферментативной активности. Согласно данным электрофореза в полиакриламидном геле, полученные препараты фермента были гомогенны. Величина удельной ферментативной активности составляла 10 мкмоль/мин на 1 мг белка. Формиатдегидрогеназу хранили в 0,05 М фосфатном буфере, pH 7,0, в присутствии 0,5 мМ меркаптоэтанола при 4° С. Перед проведением экспериментов фермент пропускали через колонку с сефадексом G-25, уравновешенным 0,5 мМ меркаптоэтанолом в дистиллированной воде, для удаления фосфатного буфера.

*Активность формиатдегидрогеназы* определяли на анализаторе скоростей ферментативных реакций Reaction Rate Analyzer, модель 2086-11 (ЛКВ, Швеция), в 0,05 М фосфатном буфере, pH 7,0, при 37° С и концентрациях NAD и формиата 1,5 мМ и 0,3 М соответственно. Концентрацию нативного фермента определяли спектрофотометрически при 278 нм на спектрофотометре Hitachi, модель 200-20 (Япония), исходя из коэффициента экстинкции  $127 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$  [5].

*Инактивация формиатдегидрогеназы реагентом Вудварда К.* К 0,5 мл фермента (9 мкМ) добавляли 250 мкл 1 М раствора гексаметилендиамина, pH 6,0, дистиллированную воду, по необходимости защитные агенты (NAD или NADH) и 25–250 мкл раствора реагента Вудварда К (13,2 мМ) в дистиллированной воде, pH 3,1, до общего объема 1 мл (25° С). Через определенные промежутки времени отбирали пробы по 10 мкл и измеряли ферментативную активность.

Контроль за величиной pH растворов реагентов и реакционной смеси осуществляли с помощью pH-метра Beckman, модель 4500 (США), в термостатируемой при 25° С ячейке с точностью до 0,01 ед. pH.

При определении зависимости степени инактивации формиатдегидрогеназы от числа модифицированных карбоксильных групп модификацию фермента проводили в отсутствие гексаметилендиамина. К 0,8 мл формиатдегидрогеназы (12 мкМ) добавляли или 50 мкл дистиллированной воды, или 50 мкл раствора NADH (8,8 мМ) и 150 мкл раствора реагента Вудварда К (10 мМ) до общего объема 1 мл. По достижении определенной степени инактивации реакцию останавливали добавлением 400 мкл 3 М раствора формиата натрия в дистиллированной воде, pH 7,5. Избыток модифицирующего агента удаляли с помощью гель-фильтрации на колонке (0,9×60 см) с сефадексом G-50 (сверхтонкий), уравновешенным 0,05 М фосфатным буфером, pH 7,0. Концентрацию модифицированного фермента определяли по Лоури [16]. Количество модифицированных карбоксильных групп рассчитывали по увеличению поглощения при 267 нм, исходя из коэффициента экстинкции  $18,7 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$  [13]. Спектры нативной и модифицированной формиатдегидрогеназы записывали на спектрофотометре Beckman, модель 3600 (США).

Кинетические параметры и рН-зависимость наблюдаемой константы скорости инактивации обчитывали на микроЭВМ Sord, модель 220-III (Япошия), методом наименьших квадратов с учетом статистических весов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Попов В. О., Родионов Ю. В., Егоров А. М., Березин И. В. Биохимия, 1978, т. 43, № 7, с. 1212-1221.
2. Попов В. О., Егоров А. М. Биохимия, 1979, т. 44, № 2, с. 207-213.
3. Тишков В. П., Попов В. О., Егоров А. М. Биохимия, 1980, т. 45, № 2, с. 317-324.
4. Egorov A. M., Tishkov V. I., Dainichenko V. V., Popov V. O. Biochim. et biophys. acta, 1982, v. 709, № 1, p. 8-12.
5. Egorov A. M., Avilova T. V., Dickov M. M., Popov V. O., Rodionov Y. V., Berезин I. V. Eur. J. Biochem., 1979, v. 99, № 1, p. 569-576.
6. Means C. E., Feeney R. E. In: Chemical modification of proteins. San-Francisco, Cambrige, London, Amsterdam: Holden Day Ins., 1981, p. 28-46.
7. Hoare D. G., Koshland D. E. J. Biol. Chem., 1967, v. 242, № 10, p. 2447-2453.
8. Угарова Н. П., Курузова Г. Д., Рогожин В. В., Савицкий А. П., Скурда Л. А. Биоорган. химия, 1982, т. 8, № 9, с. 1180-1188.
9. Bodlaender P., Feinstein G., Shaw E. Biochemistry, 1969, v. 8, № 12, p. 4941-4948.
10. Feinstein G., Bodlaender P., Shaw E. Biochemistry, 1969, v. 8, № 12, p. 4949-4955.
11. Petra P. H. Biochemistry, 1971, v. 10, № 17, p. 3163-3170.
12. Попов В. О., Родионов Ю. В., Егоров А. М., Березин И. В. Докл. АН СССР, 1978, т. 239, с. 214-217.
13. Woodward R. B., Olofson R. A. Tetrahedron Suppl., 1966, v. 7, p. 415-440.
14. Branden C.-I., Jornvall H., Eklund H., Furugren B. In: The Enzymes/Ed. Boer P. N. Y.: Acad. Press, 1975, v. XI, part A, p. 103-190.
15. Rossman M. G., Liljas A. J., Branden C.-I., Banaszak C. J. In: The Enzymes/Ed. Boer P. N. Y.: Acad. Press, 1975, v. XI, part A, p. 61-102.
16. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem., 1951, v. 193, p. 265-275.

Поступила в редакцию  
23.III.1983

#### CHEMICAL MODIFICATION OF CARBOXYL GROUPS OF BACTERIAL FORMATE DEHYDROGENASE

TISHKOV V. I., EGOROV A. M., POPOV V. O.

*Division for Chemical Enzymology, M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow;  
A. N. Bakh Institute of Biochemistry, Academy  
of Sciences of the USSR, Moscow*

Chemical modification of carboxyl groups in formate dehydrogenase from methylotrophic bacterium *Achromobacter parvulus* T1 by N-ethyl-5-phenylisoxasolium-3'-sulphonate (Woodward's reagent K), results in complete inactivation of the enzyme. The influence of the reagent concentration, pH, as well as of coenzymes and some other compounds on the enzyme inactivation rate was studied. It was shown that modification of formate dehydrogenase proceeds in two steps: 1) reversible binding of the enzyme into a binary complex with Woodward's reagent K and 2) enzyme modification in this complex. Complete loss of the enzymatic activity took place at modification of one carboxyl group per formate dehydrogenase subunit. In the presence of saturating concentrations of NADH and NAD, complete preservation of the enzyme activity was achieved and the functionally essential carboxyl group was protected against modification. The presence of one essential carboxyl group in or near the coenzyme-binding region of the enzyme active site was surmised.