

ВЛИЯНИЕ РЕДОКС-ПОТЕНЦИАЛА СРЕДЫ НА КАТАЛИТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ НАД-ЗАВИСИМОЙ ГИДРОГЕНАЗЫ

Р. Р. Петров, И. Б. Уткин, А. М. Егоров, В. О. Попов

Интерес, проявляемый к НАД-зависимым гидрогеназам (КФ 1.12.1.2) обусловлен как теоретическими аспектами исследования полундерных окислительно-восстановительных металлоферментов, так и возможностями их биотехнологического применения.

В последнее время появляется все больше свидетельств тому, что одним из главных факторов, определяющих состояние ферментативной активности гидрогеназ, является окислительно-восстановительный потенциал среды [1—6]. Однако до сих пор изучение влияния редокс-потенциала на каталитические свойства НАД-зависимых ферментов этого класса носило лишь предварительный характер [7, 8].

Целью настоящей работы является выяснение связи между состоянием окисления электротранспортной цепи растворимой НАД-зависимой гидрогеназы водородокисляющих бактерий *Alcaligenes eutrophus* Z1 и ее каталитическими свойствами.

Материалы и методы. Методика выделения и очистки фермента описана в [9]. Чистоту фермента проверяли методом высокоэффективной жидкостной гель-фильтрации с использованием колонки ТСК-3000 (300×7,6 мм). Содержание примесей, которые были обусловлены высокомолекулярными агрегатами гидрогеназы, не превышало 5 %.

Для редокс-титрования использовали электрохимическую анаэробную ячейку, описанную ранее [1]. Концентрация фермента в ячейке составляла ~8 мкМ. После уравновешивания раствора при определенном значении редокс-потенциала E_h из ячейки отбирали аликвоты объемом 40 мкл и вносили в спектрофотометрическую кювету (3 мл) для определения гидрогеназной (восстановление НАД водородом) или диафоразной (окисление НАДН 2,6-дихлорфенолиндофенолом) активностей (0,1 М К-фосфатный буфер, рН 7,8, 25 °С; концентрации НАД(Н) — 1 мМ, 2,6 дихлорфенолиндофенола — 2 мМ). Измерение потенциала в ячейке проводили анаэробно в 0,5 М К-фосфатном буфере, рН 7,8, на платиновом электроде против насыщенного каломельного электрода в присутствии ряда переносчиков (2,6-дихлорфенолиндофенол, метиленовый синий, резазурин, сафранин Т, бензилвиологен, метилвиологен; концентрация всех переносчиков — 10 мкМ). Для титрования использовали растворы дитионита натрия и феррицианида калия. Активности измеряли в условиях насыщения по всем субстратам.

Для изучения влияния редокс-потенциала среды на гидрогеназную активность с метилвиологеном (поглощение водорода в присутствии окисленной формы метилвиологена) был использован метод интегральных кинетических кривых. Реакции проводились в анаэробных кюветах и регистрировались спектрофотометрически (700 нм, 0,1 М К-фосфатный буфер, рН 7,8, 25 °С; концентрация метилвиологена — 0,2÷2 мМ) по изменению концентрации восстановленной формы метилвиологена. По полученным таким образом интегральным кинетическим кривым находили значения скоростей реакций в различные моменты времени. Этим значениям скоростей ставили в соответствие рассчитанные в этих же точках интегральных кривых величины редокс-потенциала среды, которые вычисляли на основе уравнения Нернста, исходя из определенного спектрофотометрически соотношения концентраций окисленной и восстановленной форм метилвиологена. Для вычислений использовали коэффициент миллимолярной экстинкции восстановленной формы метилвиологена $\epsilon_{700} = 2,6 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$ и стандартный потенциал метилвиологена $E'_{0} = -446 \text{ мВ}$.

Результаты и обсуждение. НАД-зависимая гидрогеназа является полифункциональным ферментом и способна катализировать несколько химических процессов, включая гидрогеназные реакции с физиологическим (НАД) и искусственными акцепторами электронов, а также диафоразные реакции [9, 10]. Влияние редокс-потенциала на некоторые типы каталитической активности фермента представлено на рис. 1 и 2.

При значениях $E_h < -350 \text{ мВ}$ фермент теряет способность катализировать НАД(Н)-зависимые реакции (рис. 1). Потеря каталитических свойств носит обратимый характер — при повышении редокс-потенциала системы активность фермента возвращается к исходному уровню. Процесс восстановления соответствует одноэлектронному переходу, а соответствующее значение потенциала E_m составляет около -300 мВ .

Катализируемый гидрогеназой процесс поглощения водорода в присутствии метилвиологена также зависит от окислительно-восстановительного потенциала среды (рис. 2). Однако в этом случае редокс-переход соответствует двухэлектронному процессу и характеризуется значением $E_m \approx -400 \text{ мВ}$. Величина E_m не зависит от рН в диапазоне 6,9—8,6, что свидетельствует о том, что лимитирующая стадия процесса

не связана с переносом протонов. Варьирование начальной концентрации окисленной формы метилвиологена от 0,2 до 2 мМ также не приводило к сдвигу наблюдаемого значения E_m .

Найденный характер зависимости каталитических активностей гидрогеназы от потенциала может быть интерпретирован в рамках описанной ранее схемы электрон-транспортной цепи гидрогеназы [11]. Согласно этой модели, все простетические группы гидрогеназы *A. eutrophus* Z1 можно в соответствии с их потенциалом разделить на три класса: 1) регуляторный [2Fe—2S] кластер, $E_m \sim -100$ мВ; 2) ФМН и сово-

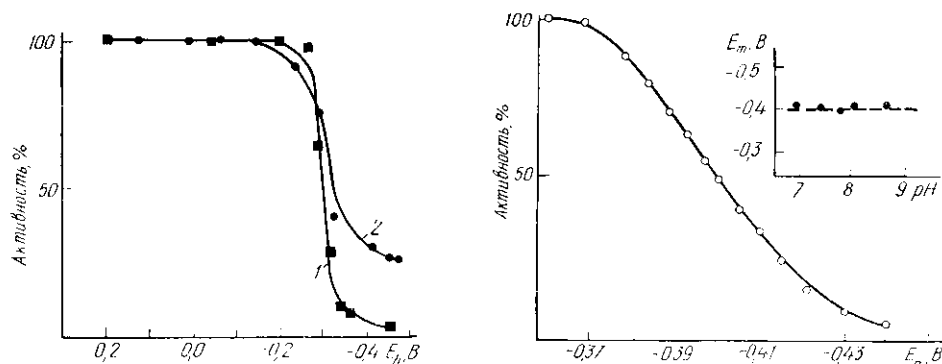


Рис. 1. Влияние редокс-потенциала на НАД(Н)-зависимые реакции, катализируемые гидрогеназой *A. eutrophus* Z1: 1 — восстановление НАД водородом; 2 — восстановление 2,6-дихлорфенолиндофенола в присутствии НАДН (рН 7,8, 25 °С)

Fig. 1. Redox titration of hydrogenase from *A. eutrophus* Z1: 1 — hydrogen uptake activity with NAD; 2 — diaphorase activity with dichlorophenol indophenol as an acceptor (0.5 M K-phosphate buffer, pH 7.8, 25 °C)

Рис. 2. Влияние редокс-потенциала на катализируемую гидрогеназой реакцию поглощения водорода в присутствии метилвиологена (рН 7,8, 25 °С). В правом верхнем углу рисунка — значения E_m при различных значениях рН

Fig. 2. The hydrogen uptake activity of enzyme with methyl viologen. The dependence on the redox potential of the medium. The whole kinetic curve was monitored spectrophotometrically and a progressive decrease in the reaction rate was attributed to a change of the redox potential due to the product formation (0.1 M K-phosphate buffer, pH 7.8, 25 °C) INSET: pH-dependence of the obtained midpoint redox potential values

купность ЭПР-видимых парамагнетиков, локализованных в диафоразной части фермента; $E_m \sim -300 \div -330$ мВ; 3) ЭПР-недетектируемые простетические группы, предположительно формирующие центр активации водорода [12].

Данная модель предсказывает возможность существования не менее трех редокс-переходов на кривых титрования гидрогеназы, соответствующих восстановлению простетических групп фермента с близкими значениями потенциалов. Так, например, редокс-переход около -300 мВ, контролирующей каталитическую активность фермента с участием кофактора, может быть приписан восстановлению ФМН или одного, или нескольких железо-серных центров в диафоразной части гидрогеназы, имеющих близкий потенциал.

Обратимая инактивация гидрогеназы при низких (< -350 мВ) потенциалах может иметь важное физиологическое значение, обеспечивая тонкий механизм регуляции каталитической активности фермента. При высоком редокс-потенциале в клетках активность гидрогеназы максимальна. При накоплении восстановительных эквивалентов и снижении потенциала фермент обратимо «выключается». Следует отметить, что наблюдаемое значение E_m близко к стандартному потенциалу пары НАД/НАДН (-320 мВ, рН 7,0). Это предполагает возможность контроля каталитической активности гидрогеназы за счет пула никотинамидадениндинуклеотидов.

Довольно трудно на настоящем этапе провести отнесение редокс-центра ($E_m \sim -400$ мВ), контролирующего гидрогеназную активность фермента с метилвиологеном. Можно предположить, что он локализован в гидрогеназной части молекулы белка и принадлежит «молчащему» [4Fe—4S] кластеру. Маловероятно, однако, что это непосредственный центр активации водорода, поскольку расщепление молекулы H_2 и образование гидридного комплекса не являются стадиями, лимитирующими гидрогеназную активность фермента [13]. Следует отметить, что кластер с близким потенциалом был зарегистрирован в гидрогеназе *A. eutrophus* H16 [14].

Таким образом, приведенные в настоящей работе экспериментальные данные позволяют утверждать, что одним из существенных факторов, определяющих каталитические свойства НАД-зависимой гидрогеназы из *A. eutrophus* Z1, является состояние окисления электронтранспортной цепи фермента.

Авторы выражают признательность Н. Н. Зорину за предоставление электрохимической анаэробной ячейки и В. Фернандесу за полезное обсуждение данной работы.

THE EFFECT OF REDOX POTENTIAL OF THE MEDIUM ON THE CATALYTIC ACTIVITY OF NAD-DEPENDENT HYDROGENASE

R. R. Petrov, I. B. Utkin, A. M. Egorov, V. O. Popov

A. N. Bach Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow
Chemical Department of Moscow University

Summary

The effect of redox potential of the medium on the catalytic properties of soluble hydrogenase from hydrogen-oxidizing bacteria *Alcaligenes eutrophus* Z1 was studied. Two transitions on the catalytic activity of the enzyme vs redox potential profiles are observed: transitions with $E_m \approx -300$ mV and $E_m \approx -400$ mV control NAD(H)-dependent activities of enzyme and hydrogen uptake reaction with methyl viologen, respectively. These redox transitions may be accounted for by the model of the intramolecular electron transport chain of hydrogenase. A possible physiological role of the redox regulation of the hydrogenase catalytic activity is discussed. It is assumed that hydrogenase is regulated in vivo by the pool of nicotinamide adenine dinucleotides.

1. Зорин Н. Н., Серебрякова Л. Т., Гогогов И. Н. Влияние окислительно-восстановительного потенциала на активность гидрогеназ пурпурных бактерий // Биохимия.— 1984.— 49, № 8.— С. 1316—1319.
2. Fernandez V. M., Aguirre R., Hatchikian E. C. Reductive activation and redox properties of hydrogenase from *Desulfovibrio gigas* // Biochim. et biophys. acta.— 1984.— 790, N 1.— P. 1—7.
3. Lissolo T., Pulvin S., Thomas D. Reactivation of the hydrogenase from *Desulfovibrio gigas* by hydrogen. Influence of redox potential // J. Biol. Chem.— 1984.— 259, N 19.— P. 11725—11729.
4. Kinetic properties of hydrogenase isolated from *Desulfovibrio vulgaris* (Hildenborough) / H. J. Grande, A. van Berkel-Arts, J. Breght et al. // Eur. J. Biochem.— 1983.— 131, N 1.— P. 81—88.
5. Van Dijk C., Veeger C. The effect of pH and redox potential on the H₂-production activity of the hydrogenase from *M. elsdenii* // Ibid.— 1981.— 114, N 2.— P. 209—219.
6. Fernandez V. M., Munilla R., Ballesteros A. Influence of the redox potential on the activity of *Clostridium pasteurianum* and *Chromatium hydrogenases* // Arch. Biochem. and Biophys.— 1982.— 215, N 1.— P. 129—135.
7. Пинчукова Е. Е., Варфоломеев С. Д., Кондратьева Е. Н. Выделение, очистка и исследование стабильности растворимой гидрогеназы *Alcaligenes eutrophus* Z1 // Биохимия.— 1979.— 44, № 4.— С. 605—611.
8. Schneider K., Schlegel H. G. Purification and properties of the soluble hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus* H16 // Biochim. et biophys. acta.— 1976.— 452, N 1.— P. 66—80.
9. Inactivation of the hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus* Z1 under the action of urea and limited proteolysis / V. O. Popov, I. B. Utkin, I. G. Gazaryan et al. // Ibid.— 1984.— 789, N 2.— P. 210—215.
10. Schneider K., Schlegel H. G., Jochim K. Effect of nickel on activity and subunit composition of purified hydrogenase from *Nocardia opaca* 1b // Eur. J. Biochem.— 1984.— 138, N 3.— P. 533—541.
11. Catalytic activity-quaternary structure relationship / V. O. Popov, I. V. Berezin, A. A. Zaks et al. // Biochim. et biophys. acta.— 1983.— 744, N 3.— P. 298—303.
12. Hornhardt S., Schneider K., Schlegel H. Characterization of a native subunit of the NAD-linked hydrogenase isolated from a mutant of *Alcaligenes eutrophus* H16 // Biochimie.— 1986.— 68, N 1.— P. 15—24.
13. Газарян И. Г. Структура НАД-зависимой гидрогеназы водородокисляющих бактерий *Alcaligenes eutrophus* Z1 и кинетические особенности ее действия: Автореф. дис. ... канд. хим. наук.— М., 1984.— 27 с.
14. The iron-sulphur centres of soluble hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus* / K. Schneider, R. Cammack, H. Schlegel, D. O. Hall // Biochim. et biophys. acta.— 1979.— 578, N 4.— P. 445—461.

Ин-т биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, Москва
МГУ им. М. В. Ломоносова

Получено 17.11.86