

Характеристика свойств фумараз А и С из облигатного метанотрофа *Methylobacterium alcaliphilum* 20Z

Мельников О.И.^{1,2}, Розова О.Н.¹, Хмеленина В.Н.¹

¹ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»,
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина,
²ФГБОУ ВО Пушинский государственный естественно-научный институт;
oleg96mel@gmail.com, rozovaolga1@rambler.ru

Фумараза, являясь одним из ферментов цикла Кребса, обратимо катализирует гидратацию фумарата до малата. Фумараза в живом мире представлена двумя биохимически различными классами: А и С. Фумаразы класса А являются термолабильными, чувствительны к кислороду и имеют 4Fe-4S кластер в активном центре, тогда как фумаразы класса С термостабильны, не чувствительны к кислороду и не имеют железосерного кластера. Целью данной работы является изучение свойств рекомбинантных фумараз А и С из галоалкалофильного метанотрофа *Methylobacterium alcaliphilum* 20Z. Методами клонирования генов *fumA* и *fumC*, их гетерологичной экспрессии в клетках *Escherichia coli* BL21(DE3) и последующей аффинной хроматографией на Ni-NTA агарозе были получены рекомбинантные ферменты, несущие на С-конце навеску из 6 гистидинов.

Фумараза С из *M. alcaliphilum* обратимо катализовала превращение фумарата в малат с максимальной активностью 45 Е/мг белка в направлении образования малата и 42 Е/мг белка в обратной реакции (дегидратации малата до фумарата). Фумараза С работала в широком диапазоне рН (от 6 до 9) с оптимумом рН 8,5 в реакции гидратации фумарата и рН 8,0 в обратном направлении. Температурный оптимум фермента составил 50°C. Экспозиция фермента при 40°C в течение 30 минут снижала активность на 80%. При оптимальном рН и 30°C значение кажущейся K_m для фумарата составило $0,11 \pm 0,04$ мМ. В направлении дегидратации малата фермент не подчинялся кинетике Михаэлиса-Ментен, коэффициент Хилла n составил $2,07 \pm 0,35$, а константа $S_{0,5}$ для малата - $0,14 \pm 0,01$ мМ. В присутствии одновалентных катионов K^+ , NH_4^+ и Na^+ активность фумаразы С увеличивалась почти в 2 раза. Ионы Cu^{2+} практически полностью ингибировали активность фермента, а Zn^{2+} и Cd^{2+} снижали его активность на 78 и 50%, соответственно. Ионы Mg^{2+} и Ca^{2+} не оказывали существенного влияния на гидратацию фумарата.

На активность фумаразы С существенно влияли различные интермедиаты метаболизма *M. alcaliphilum*. Изоцитрат, цитрат и ФЕП ингибировали активность фермента на 50%, 50% и 40%, соответственно. Пируват или глицин оказывали слабое активирующее действие (на 25% и 31%, соответственно).

Помимо фумаразы С, *M. alcaliphilum* имеет фумаразу А, проявляющую 10% идентичности транслированных аминокислотных последовательностей с фумаразой С. Фумараза А метанотрофа на 70% идентична с ферментом из *Burkholderia xenovorans*, проявляющим большую специфичность к мезаконату, чем к фумарату.

Максимальная активность фумаразы А в реакции превращения фумарата в малат составила 155 Е/мг белка, а в реакции превращения малата в фумарат – 83 Е/мг белка. Фумараза А работает в диапазоне рН от 6,0 до 9,5 с оптимумом при рН 8,5 в обоих направлениях. Температурный оптимум фермента составил 30°C. Экспозиция фермента при 50°C в течение 60 минут приводила к снижению активности на 50%. Фумараза А не подчиняется кинетике Михаэлиса-Ментен, значение $S_{0,5}$ для фумарата составило $0,28 \pm 0,04$ мМ с коэффициентом Хилла n $1,4 \pm 0,2$, а константа $S_{0,5}$ для малата - $0,55 \pm 0,03$ мМ (коэффициент Хилла n $1,7 \pm 0,1$). Интермедиаты метаболизма метанотрофа: ФЕП и глюкоза-6-фосфат (в концентрации 1 и 5 мМ, соответственно), слабо снижали активность фермента (на 20%), в то же время, глицин, пируват и сукцинат (в концентрации 1 мМ) оказывали незначительное активирующее действие на фермент (на 27%, 35% и 44%, соответственно).

Фумараза А, в отличие от фумаразы С, способна использовать в качестве субстрата 2-метилфумарат (мезаконат) с образованием 2-метилмалата ((S)-цитрамалат). Активность фермента в реакции мезаконат \rightarrow (S)-цитрамалат составила 127 Е/мг белка, а $S_{0.5}$ для малата $0,24 \pm 0,02$ мМ с коэффициентом Хилла n $1,4 \pm 0,1$. В отличие от *Burkholderia xenovorans*, *M. alcaliphilum* не имеет ферментов дальнейшего метаболизма (S)-цитрамалата, следовательно, реакция с мезаконатом является общим свойством фумараз А и не имеет физиологического значения для данного метанотрофа.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (№ 18-04-00771).