

Влияние ионов железа на термическую устойчивость молекулы ТПГ2 с мутацией Р447R

Комлева П.Д.^{1*}, Терентьева Е.И.², Деев Р.², Куликов А.В.¹

¹ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

* polina.komleva@gmail.com

Ключевые слова: триптофангидроксилаза 2; серотониновая система; полиморфизм С1473G; фармакологические шапероны; ионы железа; температурная стабильность

Мотивация и цель: Фермент триптофангидроксилаза 2 (ТПГ2) катализирует первую и ключевую стадию синтеза серотонина (5-НТ) в присутствии кофактора, тетрагидробиоптерина, ионов Fe^{2+} и кислорода [1]. Полиморфизм С1473G приводит к замене Р447R в каталитическом домене фермента, что снижает активность фермента вдвое [2, 3]. Ранее было показано, что мутация нарушает 3D укладку молекулы и снижает стабильность фермента, что отражается на времени жизни молекулы [4, 5]. Фармакологические шапероны – это небольшие молекулы, способные специфически связываться с мутантными белковыми молекулами и восстанавливать их 3D-структуру. Ранее было доказано, что ВН_4 способен увеличивать температуру инактивации (T_{50}) фермента *in vitro*. Однако ВН_4 не позволяет восстановить температурную стабильность ТПГ2 до уровня дикого типа. Известно, что ионы двухвалентного железа участвуют в механизме ферментативного гидроксилирования L-триптофана и, следовательно, выполняют каталитическую функцию [1]. Способности ионов двухвалентного железа стабилизировать молекулу ТПГ2 не были изучены. Таким образом, цель данной работы – оценить эффект ионов Fe^{2+} и Fe^{3+} на термическую устойчивость ТПГ2 у мышей с мутацией Р447R.

Методы и алгоритмы: Исследование проводилось на половозрелых самцах мышей линий С57BL/6 ($n = 15$) и Balb/c ($n = 15$), несущих 1473С и 1473G аллели соответственно. Из среднего мозга выделяли ТПГ2, затем чистый экстракт от мышей одного генотипа объединяли и разделяли на порции 300 мкл. Концентрации рабочих растворов FeSO_4 и FeCl_3 составляли 0.01, 0.05, 0.2 мМ. Для определения температурной стабильности 7.5 мкл экстракта ТПГ2 смешивали с 7.5 мкл буфера или одного из рабочих растворов, затем смесь прогревали в течение 2 мин при 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, и 64 °С. Активность фермента определяли по скорости синтеза 5-гидрокситриптофана (5-НТР) после инкубации в течение 15 мин при 37 °С в присутствии L-триптофана (0.4 мМ) и кофактора 6-метил-5,6,7,8-тетрагидроптеридин (0.3 мМ). Уровень 5-НТР определяли с помощью ВЭЖХ с электрохимическим детектором. Температурную стабильность оценивали по температуре, инкубация при которой снижает активность фермента вдвое (T_{50}).

Результаты: Показано влияние факторов «генотип» ($F(1,28) = 648.7$, $p < 0.001$) и «препарат» ($F(3,28) = 192.5$, $p < 0.001$), но не их взаимодействия ($F(3,28) < 1$) на изменчивость T_{50} при воздействии ионами двухвалентного железа. Все три концентрации FeSO_4 повышают T_{50} для молекул ТПГ2 как мутантного, так и

дикого типа. При этом концентрации 0.05 и 0.2 мМ FeSO₄ повышают величину T₅₀ для мутантных молекул ТПГ2 до уровня T₅₀ для молекул ТПГ2 дикого типа.

Для ионов Fe³⁺ было показано высокое влияние факторов «генотип» (F(1,34) = 714.2, $p < 0.001$) и «препарат» (F(3,34) = 86.5, $p < 0.001$), но не их взаимодействия (F(3,34) = 1.6, $p = 0.21$) на изменчивость T₅₀. Все три концентрации FeCl₃ повышают T₅₀ для молекул ТПГ2 как мутантного, так и дикого типа. При этом ни одна из исследованных концентраций FeCl₃ не повышает величину T₅₀ для мутантных молекул ТПГ2 до уровня T₅₀ для молекул ТПГ2 дикого типа.

Увеличение T₅₀ (ΔT_{50}), вызванное двухвалентным железом (Balb/c, +4.12±0.2 °C; C57BL/6, +3.82±0.21 °C) было выше для мутантной ТПГ2 по сравнению с трехвалентным железом (Balb/c, +3.12±0.21 °C; C57BL/6, +3.63±0.21 °C).

Выводы: Соли двух- и трехвалентного железа одинаково хорошо увеличивают T₅₀ ТПГ2 дикого типа. В то же время, ионы двух валентного железа сильнее увеличивают T₅₀ мутантной ТПГ2 по сравнению с ионами трехвалентного железа. Таким образом, впервые было показано, что ионы железа, помимо каталитической функции, способны стабилизировать молекулы ТПГ2.

Финансирование: Исследование поддержано грантом РФФ № 24-15-00078.

Ferrous ions affect thermal stability of a TPH2 molecule carrying a P447R mutation

Komleva P.D.^{1*}, Terentieva E.I.², Deeb R.², Kulikov A.V.¹

¹ Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

* polina.komleva@gmail.com

Key words: tryptophan hydroxylase 2; serotonin system; C1473G polymorphism; pharmacological chaperons; ferrous ions; thermal stability

Motivation and Aim: Tryptophan hydroxylase 2 (TPH2) is an enzyme that catalyzes the first key stage of serotonin (5-HT) synthesis in presence of a cofactor, tetrahydrobiopterin (BH₄), Fe²⁺ ions and oxygen [1]. C1473G polymorphism leads to a P447R substitution in a catalytic domain of the enzyme, that decreases enzyme activity twofold [2, 3]. Previously it had been shown that the mutation disturbs molecular 3D structure and decreases stability of the enzyme, which reflects molecular lifetime [4, 5]. Pharmacological chaperons are small molecules that can specifically bind to mutant molecules and restore their folding. Recently it was indicated that BH₄ can be used to increase the temperature of the enzyme's thermal inactivation (T₅₀) in vitro. However, BH₄ does not increase TPH2's thermal stability to the level of a wild type enzyme. Divalent ferrous ions are involved in the mechanism of enzymatic hydroxylation of L-tryptophan and, therefore, perform a catalytic function [1]. Stabilizing abilities of ferrous ions have not yet been studied when applied to TPH2. Therefore, the aim of this study is to evaluate an effect of Fe²⁺ and Fe³⁺ ions on thermal stability of TPH2 in mice carrying a P447R mutation.

Methods and Algorithms: The study was conducted on mature male C57Bl ($n = 15$) and Balb/c ($n = 15$) mice, carrying 1473C and 1473G alleles respectively. TPH2 was extracted from their midbrain, then purified supernatant from the mice of the same

genotype was mixed together and aliquoted in 300 mkl portions. FeSO₄ and FeCl₃ solutions were diluted to the final concentrations of 0.01, 0.05 and 0.2 mM. To determine thermal stability, 7.5 mkl of TPH2 extract were mixed with 7.5 mkl of a buffer or an experimental solution, then the mix was heated for 2 min at 48, 50, 52, 54, 60, 62 and 64 °C. Enzyme activity was evaluated by the speed of 5-hydroxytryptophan (5-HTP) synthesis after 15 min of incubation at 37 °C in the presence of L-tryptophan (0.4 mM) and a cofactor, 6-methyl-5,6,7,8-tetrahydropteridin (0.3 mM). 5-HTP level was determined using HPLC with an electrochemical detector. Thermal stability was evaluated by the temperature, at which enzyme activity decreases twofold (T₅₀).

Results: Marked effect of “genotype” (F(1,28) = 648.7, *p* < 0.001) and “treatment” (F(3,28) = 192.5, *p* < 0.001), but not their interaction (F(3,28) < 1) on T₅₀ value, when treated with divalent ferrous ions, were shown. All three concentrations of FeSO₄ increased T₅₀ for both mutant and wild type TPH2.

As for Fe³⁺ ions, significant influence of “genotype” (F(1,34) = 714.2, *p* < 0.001) and “treatment” (F(3,34) = 86.5, *p* < 0.001) but no their interaction (F(3,28) < 1) on T₅₀ were shown. All three concentrations of FeCl₃ increased T₅₀ for both mutant and wild type TPH2. At the same time, none of the studied FeCl₃ concentrations raises T₅₀ value to the level of wild type TPH2.

T₅₀ increase (ΔT₅₀), induced by divalent iron (Balb/c, +4.12±0.2 °C; C57BL/6, +3.82±0.21°C) was greater in mutant TPH2, compared to trivalent iron effect (Balb/c, +3.12±0.21 °C; C57BL/6, +3.63±0.21 °C).

Conclusion: Divalent and trivalent iron ions increase T₅₀ value similarly well for wild type TPH2. However, divalent ferrous ions have a significantly more pronounced effect on a mutant TPH2 in comparison to trivalent ions.

Thereby, it was first shown that ferrous ions are capable of stabilizing TPH2 molecules, besides performing their catalysis function.

Funding: The study is supported by RSF No. 24-15-00078.

Список литературы/References

1. Fitzpatrick P.F. The aromatic amino acid hydroxylases: Structures, catalysis, and regulation of phenylalanine hydroxylase, tyrosine hydroxylase, and tryptophan hydroxylase. *Arch Biochem Biophys.* 2023;735:109518. doi 10.1016/j.abb.2023.109518
2. Zhang X., Beaulieu J.M., Sotnikova T.D., Gainetdinov R.R., Caron M.G. Tryptophan hydroxylase-2 controls brain serotonin synthesis. *Science.* 2004;305:217. doi 10.1126/science.1097540
3. Kulikov A.V., Osipova D.V., Naumenko V.S., Popova N.K. Association between Tph2 gene polymorphism, brain tryptophan hydroxylase activity and aggressiveness in mouse strains. *Genes Brain Behav.* 2005;4:482-485. doi 10.1111/j.1601-183X.2005.00145.x
4. Arefieva A.B., Komleva P.D., Naumenko V.S., Khotskin N.V., Kulikov A.V. *In vitro* and *in vivo* chaperone effect of (R)-2-amino-6-(1R,2S)-1,2-dihydroxypropyl)-5,6,7,8-tetrahydropterin-4(3H)-one on the C1473G mutant tryptophan hydroxylase 2. *Biomolecules.* 2023;13:1458. doi 10.3390/biom13101458
5. Arefieva A.B., Kulikov A.V. Comparison of fluorometric and chromatographic methods of *in vitro* assay of tryptophan hydroxylase 2, the key enzyme of serotonin synthesis in the brain. *Bull Exp Biol Med.* 2023;174:509-513. doi 10.1007/s10517-023-05738-w