Исследование характеристик алкогольоксидазы метилотрофных дрожжей HANSENULA POLYMORPHA в растворе методом малоуглового рентгеновского рассеяния.

Бойко К.М., Тихонова Т.В., Тихонов А.В., Липкин А.В., Ракитина Т.В., Юдкина О.В

Федеральное государственное учреждение Российский научный центр "Курчатовский институт", Учреждение Российской Академии наук Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН

Метод малоуглового рентгеновского рассеяния (SAXS) является в настоящее время одним из ключевых структурных методов для исследования характеристик белковых молекул непосредственно в растворе. Преимуществом данного метода является возможность непосредственной работы с образцом, не требующей его предварительной кристаллизации, как в случае рентгеноструктурного анализа (РСА). Данный метод позволяет получить структурную информацию об исследуемом белке или молекулярном комплексе с разрешением до 10 А. В настоящей работе данный метода был применен для исследования характеристик фермента алкогольоксидазы из Hansenula polymorpha (АО).

АО (КФ 1.1.3.13) является ключевым ферментом метилотрофного обмена метилотрофных дрожжей. Данный фермент катализирует первую реакцию диссимиляционного пути превращения метанола в углекислоту (в присутствии кислорода). АО выделена в высокоочищенном состоянии из нескольких видов метилотрофных дрожжей (удельная активность очищенного фермента в реакции окисления метанола - от 5 до 50 мкмоль/мин на мг белка). Показано, что данный белок является флавопротеином, содержащим ФАД как простетическую группу, связанную с апоферментом нековалентными связями. Нативный белок имеет молекулярную массу порядка 600 кДа. Предварительные анализы показали, что АО из H. polymorpha отличается от аналогичных ферментов других метилотрофных дрожжей расширенным диапазоном pH-оптимума реакции, а также более высоким температурным оптимумом каталитической активности, что делает его весьма перспективным для использования в качестве биосенсора.

Для эксперимента были использованы образцы АО в высокоочищенном состоянии при нескольких различных концентрациях с целью уменьшить влияние фонового сигнала. Обработка данных эксперимента при помощи программы DAMMIF показала, что данные лучше всего приближаются моделью в симметрии P42, т.е фермент является октамером. При этом расположение субъединиц в октамере таково, что 4 субъединицы расположены строго над 4-я другими субъединицами.

В центре кривой рассеяния имеется пик, который не приближается ab initio моделями ни в симметрии P42, ни в P1. Помимо этого, молекулярная масса октамера предсказанная по данным SAXS составляет порядка 500 ±50 кДа, что несколько меньше массы, полученной другими методами (600 кДа). Неописываемый моделью пик и несоответствие молекулярной массы свидетельствует скорее всего о присутствии в растворе частично диссоциированных форм фермента. В то же время основная часть фермента находится в октамерной форме.

Работа выполнена при поддержке гранта № 02.512.11.2297 Федерального Агентства по Науке и Инновациям.