

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 Å. В настоящей работе данный метод 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.