



УДК 577.158.42.02+539.26

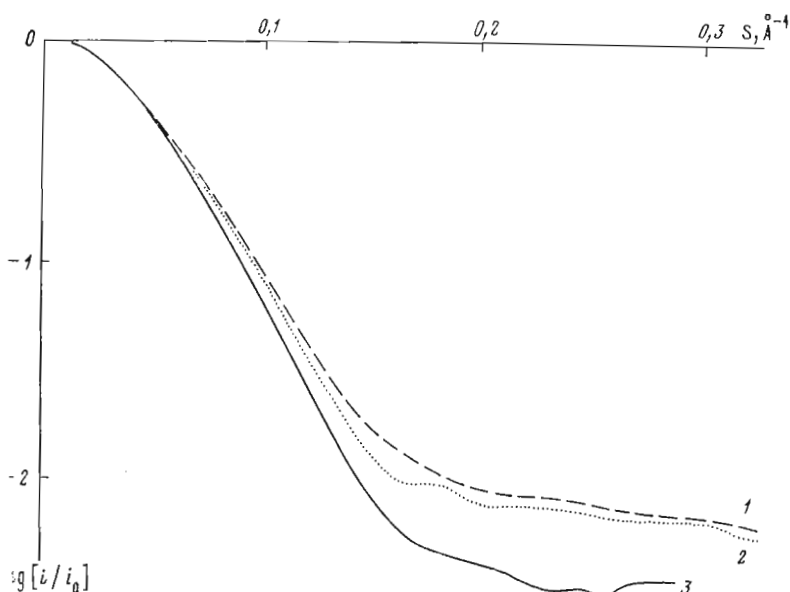
**ОБ ИЗМЕНЕНИИ ФОРМЫ ФОРМИАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ
ПРИ ПРИСОЕДИНЕНИИ КОФЕРМЕНТА ПО ДАННЫМ
РЕНТГЕНОВСКОГО МАЛОУГЛОВОГО РАССЕЯНИЯ***Асадчиков В. Е., Малашикевич В. Н., Могилевский Л. Ю.**Институт кристаллографии им. А. В. Шубникова
Академии наук СССР, Москва**Диков М. М., Егоров А. М., Осипов А. П.**Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова*

Проведено рентгеновское малоугловое исследование формиатдегидрогеназы при разных степенях комплексообразования с коферментом. Полученные значения геометрических размеров молекул апо- и холофермента и общий ход кривых рассеяния свидетельствуют об изменении формы белковой глобулы при образовании двойного комплекса.

Структура NAD-зависимых дегидрогеназ в настоящее время интенсивно исследуется различными методами. Некоторые дегидрогеназы и их комплексы с коферментами удалось получить в кристаллическом виде и затем расшифровать их структуру с разрешением 4—2 Å [1—4]. В цитируемых работах отмечается наличие конформационных перестроек молекул исследованных ферментов при их связывании с коферментом. Авторы, исследовавшие структуру дегидрогеназ методом рентгеновского малоуглового рассеяния [5—7], обнаружили изменение некоторых геометрических характеристик исследованных ими молекул при образовании комплексов с коферментом.

Настоящая работа посвящена исследованию комплекса формиатдегидрогеназы (КФ 1.2.1.2) с коферментом (NAD) при различных степенях комплексообразования. Анализ механизма действия формиатдегидрогеназы показал, что кинетическая схема действия фермента включает в себя образование тройного фермент-субстратного комплекса. Наиболее вероятен механизм с неупорядоченным присоединением субстратов и быстрым установлением равновесия между всеми фермент-субстратными комплексами. Значения констант диссоциации фермента с формиатом и NAD составляют 0,07 и $2,2 \cdot 10^{-4}$ М соответственно [8]. Посадка первого субстрата несколько облегчает присоединение второго.

Мы исследовали образцы белковых растворов со степенями комплексообразования 87 и 95%, кривые рассеяния которых представлены на рисунке. По мере увеличения степени комплексообразования спад кривых рассеяния в области главного максимума становится все более пологим; побочные максимумы также сглаживаются, а первый побочный максимум сдвигается в область меньших углов, что непосредственно говорит о глу-



Кривые малоуглового рентгеновского рассеяния молекулы форматдегидрогеназы: 1 — апофермент, 2 и 3 — комплексы форматдегидрогеназы с NAD при степени комплексообразования соответственно 87 и 95%. $S = \frac{4\pi \sin \theta}{\lambda}$ — модуль вектора рассеяния, где θ — половина угла рассеяния; i — интенсивность рассеяния, i_0 — экстраполированное к нулевому углу значение интенсивности

бокой перестройке молекул при присоединении NAD. Прямыми методами анализа мы определили значения радиуса инерции, радиуса инерции поперечного сечения и объема [10] апо- и холофермента с различной степенью комплексообразования с NAD (таблица).

С присоединением кофактора размеры и форма белковой глобулы существенно изменяются. Увеличение радиуса инерции холофермента по сравнению с апоферментом при одновременном уменьшении радиуса инерции поперечного сечения и объема свидетельствует об определенном удлинении и сплющивании молекулы белка.

Ранее мы показали [11], что область главного максимума кривой рассеяния молекулы форматдегидрогеназы хорошо совпадает с рассеянием, характерным для трехосного эллипсоида с соотношением полуосей $a : b : c = 0,5 : 1 : 1,5$. Сравнение кривых рассеяния модифицированного белка с модельными кривыми рассеяния эллипсоидов и других простых форм не дало возможности найти подходящую модель для холофермента. Полу-

Зависимость интегральных геометрических характеристик форматдегидрогеназы от степени комплексообразования (с.к.) апофермента с NAD

Форматдегидрогеназа	Геометрические характеристики молекулы белка		
	радиус инерции, Å	радиус инерции поперечного сечения, Å	объем, Å ³
Холофермент			
с.к. 95%	32,3±0,4	15,5±0,4	140 000
с.к. 85%	32,3±0,4	15,8±0,4	145 000
Апофермент	31,2±0,4	17,5±0,4	157 000

Примечание. Приведены значения радиусов инерции, полученные при экстраполяции наблюдаемых величин к нулевой концентрации белка.

ченные результаты свидетельствуют о наличии глубоких структурных изменений молекулы формиадегидрогеназы при образовании комплекса с коферментом. Для их объяснения необходимо привлечь биохимические данные и данные о структуре других дегидрогеназ. Отметим, что для исследованных NAD-зависимых дегидрогеназ характерно субъединичное строение, причем в каждой субъединице присутствуют разделенные глубокими гидрофобными карманами каталитический и NAD-зависимый домены. Образование комплекса с коферментом сопровождается значительным изменением взаимного расположения доменов и лишь небольшими перестройками в их структуре. Наши данные можно интерпретировать как свидетельство взаимного отдаления фрагментов молекулы фермента при образовании комплекса с коферментом.

Экспериментальная часть

Условия приготовления препаратов фермента с заданной степенью комплексообразования описываются системой уравнений:

$$\begin{cases} E + EN = E_0 \\ N + EN = N_0 \\ K_d = \frac{EN}{E \cdot N} \\ EN = m E_0 \end{cases}$$

где E_0 и N_0 — начальные концентрации активных центров фермента и NAD, E и N — концентрации свободных фермента и NAD после образования комплекса, EN — концентрация комплекса фермент — NAD, m — степень комплексообразования.

Как было указано выше, мы исследовали препараты формиадегидрогеназы со степенями комплексообразования 87 и 95%. В первом случае концентрация белкового раствора составляла 32, во втором — 33 мг/мл; из него путем разбавления были получены растворы белка с концентрациями 16,5 и 11 мг/мл.

Измерение интенсивностей рентгеновского малоуглового рассеяния проводилось на щелевом автоматическом дифрактометре «Амур-1» и на дифрактометре системы «Кратки». В качестве источника рентгеновского излучения использовали рентгеновскую трубку БСВ-11 с медным анодом (напряжение 30 кВ, сила тока 30 мА). Детектором служил сцинтилляционный счетчик. Монохроматизация достигалась применением никелевого фильтра и амплитудного дискриминатора. Измерения проводили в кюветах или тонкостенных стеклянных капиллярах.

Растворы с высоким содержанием белка исследовали на дифрактометре «Амур-1» в интервале углов от 0,3 до 5°. Ширину приемной щели дифрактометра выбирали равной ширине пучка в плоскости приемника. Она составляла 0,14°. Для учета изменений кривой рассеяния, обусловленных концентрационным эффектом, растворы белка исследовали на камере «Кратки» в интервале углов от 0,15 до 2,5°. В этом случае ширина формирующей щели была 60 мкм, приемной щели — 120 мкм (0,03°). В каждой точке углового диапазона суммарная интенсивность составляла не менее 10 000 импульсов.

Интенсивность рассеяния молекулами фермента определялась как разность между рассеянием раствором белка и буферным раствором, помещенным в ту же кювету (капилляр), с учетом соответствующих коэффициентов поглощения. Концентрацию NAD в буферном растворе выбирали такой же, какой была концентрация свободного NAD в белковом растворе. Экспериментально полученные значения интенсивности рассеяния усредняли и сглаживали на ЭВМ. Затем проводили экстраполяцию интенсивностей рассеяния к нулевой концентрации (для образцов, исследованных

на камере «Кратки»); вводили коллимационную поправку на высоту щелей [9].

Для серии измерений белковых растворов со степенью комплексообразования 95% кривые, полученные с двух дифрактометров, «сшивали» по перекрывающемуся участку, получая таким образом единую кривую рассеяния в диапазоне углов от 0,15 до 5°.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бландел Т., Джонсон Л. (1979) Кристаллография белка, «Мир», М.
2. White J. L., Hackert M. L., Buehner M., Adams M. J., Ford G. C., Lentz P. J., Smiley I. E., Steindel S. J., Rossmann M. G. (1976) *J. Mol. Biol.*, **102**, 759-779.
3. Platt B. V., Eklund H., Bränden K. I. (1978) *J. Mol. Biol.*, **122**, 23-32.
4. Eklund H., Bränden K. I. (1979) *J. Biol. Chem.*, **254**, 3458-3461.
5. Kratky O., Pilz I. (1972) *Quart. Rev. Biophys.*, **7**, 481-537.
6. Durchschlag H., Puchwein G., Kratky O. (1971) *Eur. J. Biochem.*, **19**, 9-22.
7. Simon I. (1972) *Eur. J. Biochem.*, **30**, 184-189.
8. Попов В. О., Родионов Ю. В., Егоров А. М., Березин И. В. (1978) *Биоорган. химия*, **4**, 117-129.
9. Фейгин Л. А., Щедрин Б. М. (1966) *Кристаллография*, **11**, 159-163.
10. Каюшина Р. Л., Рольбин Ю. А., Фейгин Л. А. (1974) *Кристаллография*, **19**, 1161-1165.
11. Асадчиков В. Е., Дембо А. Т., Диков М. М., Осипов А. П., Егоров А. М., Березин И. В. (1979) *Докл. АН СССР*, **246**, 130-133.

Поступила в редакцию
19.III.1980

После доработки
14.V.1980

SMALL-ANGLE X-RAY SCATTERING DATA FOR A CHANGE IN FORMATE DEHYDROGENASE SHAPE UPON COENZYME BINDING

ASADCHIKOV V. E., MALASHKEVICH V. N., MOGILEVSKY L. Yu.,
DIKOV M. M., EGOROV A. M., OSIPOV A. P.

*A. V. Shubnikov Institute of Crystallography, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow; M. V. Lomonosov State University, Moscow*

Formate dehydrogenase solutions were studied by small-angle X-ray scattering at various stages of coenzyme binding. The differences in values of geometrical parameters for apo and holoenzymes, as in general form of the X-ray scattering curve, provide evidence for a change in the shape of protein globule accompanying the formation of a binary complex.