



УДК 577.112.5:577.152.121'134

**СТРУКТУРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ NAD-ЗАВИСИМОЙ
ФОРМИАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ МЕТИЛОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ.
ЛОКАЛИЗАЦИЯ СУЩЕСТВЕННОГО ОСТАТКА ЦИСТЕИНА***Устильников Т. Б., Попов В. О., Егоров Ц. А. ***Институт биохимии им. А. Н. Баха Академии наук СССР, Москва;***Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова Академии наук СССР, Москва*

На примере NAD-зависимой формиатдегидрогеназы из *Pseudomonas* sp. 101 показана высокая эффективность использования метода ковалентной хроматографии для локализации существенных остатков цистеина в белках. Формиатдегидрогеназу, существенные SH-группы которой были селективно модифицированы флуоресцентной или радиоактивной метками на основе йодацетампда, иммобилизовали в денатурирующих условиях на тиопротил-сефарозе. Образовавшийся конъюгат подвергали триптическому гидролизу, в результате чего были получены две фракции пептидов, одна из которых (иммобилизованная) состояла из цистеинсодержащих белковых фрагментов. Выделены и секвенированы все цистеинсодержащие триптические пептиды формиатдегидрогеназы. Показано, что наблюдается селективное включение метки в один из пептидов, содержащий два остатка цистеина. Установлено, что специфической модификации подвергается Cys¹⁴ в пептиде TС1.

В структурно-функциональном анализе ферментов важное место занимает задача локализации аминокислот, входящих в состав активного центра. Как правило, для этого используют специальные, легко детектируемые метки (радиоактивные, флуоресцентные и т. д.), специфически взаимодействующие с определенным типом функциональных групп белков. Для локализации в первичной структуре белка аминокислотных остатков, принадлежащих активному центру фермента, необходимо выделить содержащие метку пептиды из сложной смеси белковых фрагментов, образующихся в результате ферментативного или химического расщепления полипептидной цепи. Эта сама по себе непростая задача особенно усложняется при исследовании крупных фрагментов, когда в результате расщепления образуются десятки пептидов.

В настоящее время в структурных исследованиях белков широко используются методы ковалентной хроматографии, которые включают обратимую иммобилизацию белка на нерастворимых носителях с последующей фрагментацией образующегося конъюгата химическими или ферментативными способами. Этот подход значительно упрощает схему разделения сложной смеси пептидов, позволяет проводить селективное выделение фракции иммобилизованных пептидов и в конечном счете повышает эффективность исследования первичной структуры белка [1, 2]. Особенно широко метод ковалентной хроматографии используют при структурно-функциональном исследовании мембранных белков [3, 4].

Среди различных функциональных групп белков (аминогруппы остатков лизина, карбоксильные группы аспарагиновой и глутаминовой аминокислот, OH-группы серина и тирозина и т. д.) особое место по своей реакционной способности и лабильности занимают SH-группы остатков цистеина тиолзависимых ферментов. В настоящей работе на примере бактериальной NAD-зависимой формиатдегидрогеназы демонстрируется высокая эффективность применения методов ковалентной хроматографии для локализации существенных остатков цистеина, входящих в состав активного центра ферментов.

NAD-Зависимая формиатдегидрогеназа из *Pseudomonas* sp. 101 характеризуется высоким содержанием тиольных групп. Молекула фермента содержит шесть остатков цистеина на субъединицу, различающихся

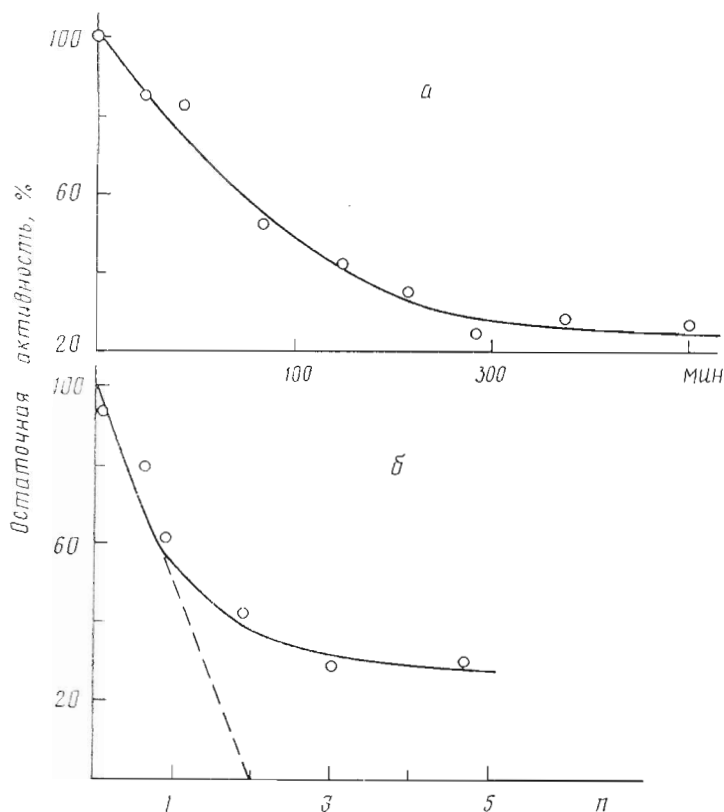


Рис. 1. Модификация NAD-зависимой форматдегидрогеназы I-AEDANS: а — кинетика инактивации форматдегидрогеназы (0,82 мкМ) в присутствии I-AEDANS (4,0 мкМ); калий-фосфатный буфер, рН 7,5; 25° С; б — корреляция между числом молекул метки (n), включенных в молекулу форматдегидрогеназы, и остаточной активностью фермента

своей доступностью и реакционной способностью [5]. Одна из шести тиольных групп в субъединице форматдегидрогеназы обладает аномально высокой реакционной способностью и, вероятно, находится в районе активного центра фермента, так как ее избирательное блокирование приводит к полной потере ферментативной активности [5, 6]. Состояние окисленности остатка цистеина активного центра определяет также и стабильность NAD-зависимой форматдегидрогеназы [7].

Для локализации остатка цистеина, существенного для проявления каталитической активности NAD-зависимой форматдегидрогеназы, нами была осуществлена специфическая модификация этого реакционноспособного тиола с помощью меток на основе подацетамида: иод[^{14}C]ацетамида и N-иодацетил-N'-(5-сульфо-1-нафтил)этилендиамина (I-AEDANS). Ранее [6] было установлено, что иодацетамид блокирует существенную SH-группу в субъединице NAD-зависимой форматдегидрогеназы, что приводит к полной инактивации фермента.

При модификации нативного фермента I-AEDANS на начальном этапе наблюдается линейная корреляция между включением метки и каталитической активностью форматдегидрогеназы вплоть до модификации ~ 1 SH-группы на молекулу фермента (рис. 1). В связи с этим для экспериментов по триптическому гидролизу использовались препараты форматдегидрогеназы с остаточной активностью не менее 40%.

Для получения цистеинсодержащих пептидов нативный и модифицированный белок иммобилизовали на тиопропил-сефарозе 6В. В результате триптического гидролиза конъюгата немодифицированного фермента образовались две фракции пептидов, одна из которых (пептиды, содержащие остатки цистеина) оставалась связанной с носителем. После снятия пептидов обработкой β -меркаптоэтанолом и алкилирования освободив-

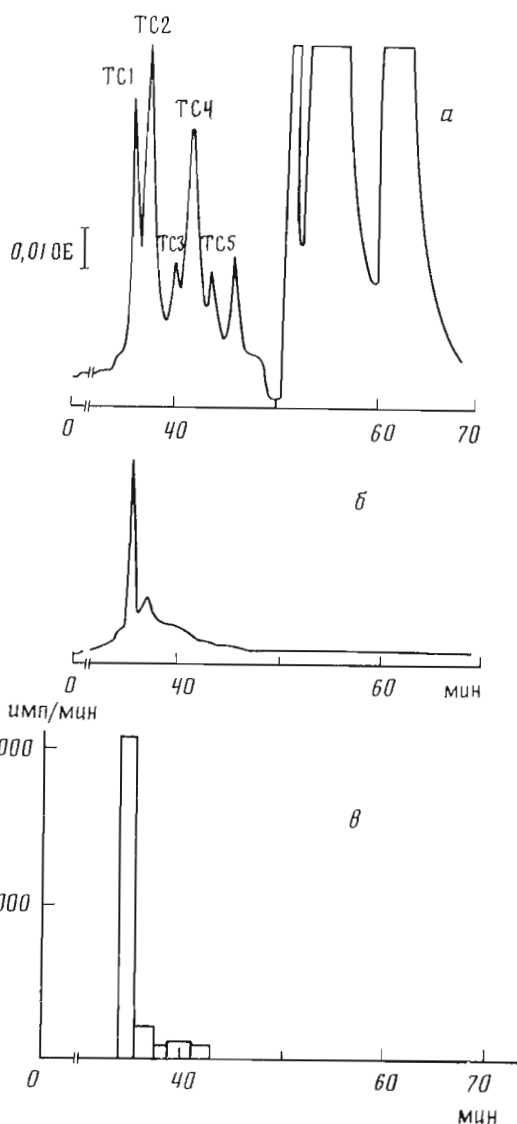


Рис. 2. Высокоэффективная жидкостная хроматография триптических цистеинсодержащих пептидов NAD-зависимой форматдегидрогеназы на колонке ($7,6 \times 600$ см) с носителем TSK-2000 SW, уравновешенной 0,1% трифторуксусной кислотой. Скорость элюции 0,5 мл/мин. Детекция пептидов: *a* — немодифицированного фермента (поглощение при 210 нм); *б* — предварительно модифицированного I-AEDANS (флуоресценция при 500 нм); *в* — под ^{14}C ацетамидом (данные измерения радиоактивности)

шихся SH-групп 4-винилпиридином было получено пять пептидов: TC1 — TC5 (рис. 2*a*). Наличие лишь пяти иммобилизованных пептидов после стадии триптического гидролиза вместо шести ожидаемых на основании содержания остатков цистеина в субъединице форматдегидрогеназы указывает на то, что по крайней мере один из них содержит две тиольные группы.

При иммобилизации препаратов форматдегидрогеназы, модифицированной флуоресцентной меткой, и последующего триптического гидролиза не происходит уменьшения числа иммобилизованных цистеинсодержащих пептидов, ~85% метки включается в фракцию иммобилизованных пептидов и лишь ~15% переходит в растворимую фракцию. До 90% метки, включенной во фракцию цистеинсодержащих пептидов, связывается в пептиде TC1 (рис. 2*б*). Это находится в соответствии с тем, что данный пептид содержит два остатка цистеина, один из которых, таким образом, является существенным.



Рис. 3. Аминокислотная последовательность триптических цистеинсодержащих пептидов NAD-зависимой форматдегидрогеназы, модифицированной под[¹⁴C]ацетамидом. Cys* — S-β-(4-пиридилэтил)цистеин, Cys** — S-[¹⁴C]карбоксамидометилцистеин

Для уточнения положения существенного остатка цистеина в пептиде TC1 проводили модификацию форматдегидрогеназы под[¹⁴C]ацетамидом. Селективность процесса модификации подтверждается тем, что ~60% метки входит в пептид TC1 (рис. 2б). Положение существенного остатка цистеина в пептиде TC1 (рис. 3) было определено на основании различий в хроматографическом поведении соответствующих фенилтиогидантоиновых производных пиридилэтилцистеина и карбоксиметилцистеина, образующихся в процессе секвенирования пептидного фрагмента. Установлено, что специфической модификации подвергается остаток цистеина, находящийся в 14-м положении пептида TC1.

Таким образом, с использованием метода ковалентной хроматографии определена полная аминокислотная последовательность всех цистеинсодержащих триптических пептидов NAD-зависимой форматдегидрогеназы и локализован остаток цистеина активного центра, ответственный за проявление каталитической активности и стабильности фермента. Описанный подход носит достаточно общий характер, отличается высокой эффективностью и может оказаться полезным при изучении реакционной способности и локализации тиоловых групп в белках.

Экспериментальная часть

В настоящей работе были использованы трифторуксусная кислота, гуанидин-гидрохлорид (Pierce, США), тиопронил-сефароза 6В (Pharmacia, Швеция), TPCK-трипсин (Worthington, США), N-подацетил-N'-(5-сульфо-1-нафтил)этилсиднамин (I-AEDANS), динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA) (Sigma, США).

Воду для ВЭЖХ очищали с помощью системы Milli Q (Millipore, США).

Выделение NAD-зависимой форматдегидрогеназы (КФ 1.2.1.2) было осуществлено методом, описанным ранее [5] и модифицированным введением стадии гидрофобной хроматографии на октил-сефарозе. Полученные препараты были гомогенны по данным диск-электрофореза в 7% полиакриламидном геле и гель-фильтрации на колонке TSK 3000 SW.

Модификация форматдегидрогеназы флуоресцентной и радиоактивной метками. Модификацию фермента под[¹⁴C]ацетамидом и I-AEDANS проводили как описано ранее [6]. Флуоресцентную метку AEDANS предварительно растворяли в этаноле. Концентрацию растворенного вещества определяли спектрофотометрически [8]. Для модификации белка использовали 5-кратный избыток реагента по отношению к ферменту. Избыток I-AEDANS отделяли гель-фильтрацией на колонке (1,6 × 30 см) с сефадексом G-25, уравновешенным 0,4 М калий-фосфатным буфером, pH 7,6, содержащим 1 мМ EDTA.

Иммобилизация форматдегидрогеназы на тиопронил-сефарозе. Для иммобилизации форматдегидрогеназы на тиопронил-сефарозе 6В концентрированный раствор фермента (10 мг/мл) добавляли к носителю, уравновешенному 6 М гуанидингидрохлоридом в 0,1 М аммоний-бикарбонатном буфере, pH 7,6, содержащем 1 мМ динатриевую соль EDTA. Объем носителя составлял 50% объема раствора белка. Иммобилизацию вели 6 ч при перемешивании в атмосфере азота. По окончании иммобилизации

осадочную жидкость отбирали, конъюгат промывали 6 М гуанидингидрохлоридом и уравнивали соответствующим буфером. Количество иммобилизованного белка определяли по содержанию 2-тиопиридина в надосадочной жидкости и промывках [2].

Триптический гидролиз форматдегидрогеназы, иммобилизованной на тиопропил-сефарозе, проводили как описано ранее [9].

Выделение цистеинсодержащих пептидов. После проведения триптического гидролиза водорастворимую фракцию пептидов отбирали. Носитель со связанными цистеиновыми пептидами промывали 6 М гуанидингидрохлоридом в 0,1 М аммоний-бикарбонатном буфере, рН 7,8, и уравнивали 0,1 М аммоний-бикарбонатным буфером. К конъюгату добавляли β-меркаптоэтанол из расчета 50 мкл/мл геля и оставляли на 30 мин при 20° С. После восстановления супернатант отбирали. Полученную фракцию пептидов анализировали методом ВЭЖХ на колонке TSK 2000 SW в 0,1% трифторуксусной кислоте. Для ВЭЖХ использовали хроматограф модели 322 MP (Altex, США), снабженный насосами модели 100А, детектором с переменной длиной волны модели 40—155 и флуориметром модели FL-18 (GILSON, США).

В препаративных целях фракцию цистеинсодержащих пептидов разделяли на бюгеле Р-4 в 0,01 н. CH₃COOH, содержащей 1 мМ β-меркаптоэтанол, с последующим алкилированием 4-винилпиридином [10].

Структуру цистеинсодержащих триптических пептидов определяли с помощью газожидкого секвенатора модели 470 А, работающего в режиме on-line с анализатором фенилтиогидантоновых производных аминокислот модели 120 А (Applied Biosystems, Inc., США).

ЛИТЕРАТУРА

1. Егоров Ц. А., Шахпаронов М. И., Давидович Ю. А., Лозинский В. И., Заславский Б. Ю., Рогожин С. В. // Биооргани. химия. 1977. Т. 3. № 8. С. 1111—1116.
2. Egorov Ts. A., Shakhparonov M. I. // Methods in peptide and protein sequence analysis / Ed. Chr. Birr. Amsterdam: Elsevier, 1980. P. 395—405.
3. Овчинников Ю. А., Абдулаев Н. Г., Богачук А. С. // Биол. мембраны. 1985. Т. 2. № 10. С. 962—975.
4. Арзамасова Н. М., Гевондян П. М., Чертова Е. Н., Назимов И. В., Гаврильева Е. Е., Алданова Н. А., Модянов Н. И. // Биооргани. химия. 1987. Т. 13. № 1. С. 5—13.
5. Egorov A. M., Avilova T. V., Dikov M. M., Popov V. O., Rodionov Y. V., Berezin I. V. // Eur. J. Biochem. 1979. V. 99. № 3. P. 569—576.
6. Попов В. О., Егоров А. М. // Биохимия. 1979. Т. 44. № 2. С. 207—213.
7. Dikov M. M., Osipov A. P., Egorov A. M., Karulin A. Y., Mustafayev M. I., Kabanov V. A. // J. Solid-Phase Biochem. 1980. V. 5. № 1. P. 1—4.
8. Fullmer C. S. // Analyt. Biochem. 1984. V. 142. № 2. P. 336—339.
9. Устинникова Т. Б., Попов В. О., Егоров Ц. А., Егорова А. М. // Биополимеры и клетка. 1986. Т. 2. № 3. С. 129—135.
10. Hudson E. N., Weber G. // Biochemistry. 1973. V. 12. № 21. P. 4154—4161.

Поступила в редакцию
4.11.1988

STRUCTURAL STUDIES OF THE NAD-DEPENDENT FORMATE DEHYDROGENASE FROM METHYLOTROPHIC BACTERIA. LOCALIZATION OF THE ESSENTIAL CYSTEINE RESIDUES

USTINNIKOVA T. B., POPOV V. O., EGOROV Ts. A.*

*A. N. Bach Institute of Biochemistry; * N. I. Vavilov Institute
of General Genetics, Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

A high efficiency of the covalent chromatography for the localization of the essential cysteine residues in proteins has been demonstrated by structural studies of the formate dehydrogenase from *Pseudomonas* sp. 101. The SH-group of the formate dehydrogenase critical for the enzyme's activity and stability was selectively modified with fluorescent and radioactive labels based on iodoacetamide. The modified protein was immobilized on thiopropyl sepharose under denaturing conditions and then hydrolysed with trypsin. Of two peptide pools thus obtained only one (immobilized) included cysteine-containing protein fragments. All the cysteine-containing tryptic peptides of the formate dehydrogenase were isolated and sequenced. The label was shown to be selectively incorporated in one of the peptides (TC1) containing two cysteine residues, and Cys¹⁴ was shown to be the site of selective modification in this peptide.