



УДК 577.152.121*2.01

© 1990 г.

В. С. Дамзин, А. Е. Алешин*, И. А. Шумилин,
Т. Б. Устинникова, Ц. А. Егоров**, Э. Г. Арутюнян*,
В. О. Попов

NAD-ЗАВИСИМАЯ ФОРМИАТДЕГИДРОГЕНАЗА МЕТИЛОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ *PSEUDOMONAS* sp. 101

III.* СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ

Институт биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, Москва;

* Институт кристаллографии им. А. В. Шубникова АН СССР, Москва;

** Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова АН СССР, Москва

Проведен сравнительный анализ первичной и пространственной структур NAD-зависимой форматдегидрогеназы (FDH) метилотрофных бактерий *Pseudomonas* sp. 101 и ряда структурно охарактеризованных NAD-зависимых дегидрогеназ. Показано, что FDH отличается высоким консерватизмом трехмерной структуры кофермент-связывающего домена. Установлено, что ориентация молекулярной оси симметрии относительно β -листов коферментсвязывающих доменов аналогична ориентации Р-оси в тетрамерных дегидрогеназах. С использованием представлений о пространственной гомологии проведено сопоставление аминокислотной последовательности коферментсвязывающего домена FDH с соответствующими структурами в других дегидрогеназах. Установлено, что в FDH сохраняется характерное пространственное расположение лишь одного (Asp-221) из трех ранее считавшихся инвариантными аминокислотных остатков. Два остатка глицина, найденные в структурах ранее исследованных NAD-зависимых дегидрогеназ, замещены в FDH на Ala-198 и Pro-256 соответственно. Выявлено месторасположение существенного тиола (Cys-255) и высказано предположение о роли его ближайшего окружения в конформационных изменениях фермента в процессе катализа.

NAD-зависимые дегидрогеназы принадлежат к одному из наиболее подробно изученных классов ферментов как в структурном, так и в биохимическом отношении. В настоящее время основная масса исследований по механизму действия NAD-зависимых дегидрогеназ выполняется на четырех объектах, для которых имеется детальная структурная информация: алкоголь- (LADH), лактат- (LDH), малат- (MDH) и глицеральдегид-3-фосфат- (GPD) дегидрогеназах из различных источников [3–7]. Для этих белков структурно охарактеризовано с высоким разрешением более 20 комплексов с коферментами, их аналогами и ингибиторами [8–10]. Проведен большой объем работ по исследованию свойств аналогичных комплексов в растворе с помощью различных физико-химических и кинетических методов [3–6, 11].

Круг известных структур NAD-зависимых дегидрогеназ продолжает расширяться. В последнее время был проведен рентгеноструктурный анализ глутаматдегидрогеназы *Clostridium symbiosum* низкого (6 Å) разрешения [12] и сделана попытка предсказания пространственной структуры глюкозодегидрогеназы на основании ее аминокислотной последовательности [13]. Обширен объем информации по первичным структурам NAD-зависимых дегидрогеназ. По состоянию на 1986 г. было известно около

* Сообщения I, II см. [1, 2]. Сокращения: ADPR – аденозиндифосфорибоза, DTNB – 5,5'-дитио-бис-2-нитробензоат, FDH – форматдегидрогеназа метилотрофных бактерий, LDH – лактатдегидрогеназа, MDH – малатдегидрогеназа сердца свиньи, GPD – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа мышц омара, LADH – алкогольдегидрогеназа печени лошади.

130 полных и частичных аминокислотных последовательностей этих ферментов из различных источников [14].

За более чем 20-летнюю историю структурных исследований NAD-зависимых дегидрогеназ выявлен ряд общих черт, лежащих в основе механизмов катализируемых ими химических реакций. К числу подобных структурно-функциональных закономерностей следует отнести в первую очередь сходный характер связывания кофермента с этими белками, что обусловлено присутствием в составе дегидрогеназ особого коферментсвязывающего домена, который характеризуется общей для всех белков данного семейства топологией [7–10]. Структурный мотив, характерный для NAD-зависимых дегидрогеназ (так называемая укладка по Россману), был выявлен впоследствии в ряде других белков, например киназах, флаводоксине и субтилизине, что послужило основой для формулировки гипотезы об общем эволюционном предшественнике указанных полипептидов [8].

Исключительно важную роль в функционировании NAD-зависимых дегидрогеназ играют конформационные изменения, происходящие с белками при связывании субстратов [9, 10]. Роль этих структурных перестроек заключается в формировании субстратсвязывающего участка активного центра, экранировании полости активного центра от влияния растворителя и регуляции каталитической активности фермента.

Неоднократно предпринимались попытки формулировки обобщенного механизма катализа NAD-зависимыми дегидрогеназами [9–11, 15, 16], тем не менее многие важные вопросы остаются до сих пор не выясненными.

Одним из наиболее удобных модельных объектов для исследования общих закономерностей катализа реакции переноса гидрид-иона от молекулы субстрата к молекуле NAD является NAD-зависимая форматдегидрогеназа (FDH). По-видимому, реакция, катализируемая FDH, включающая разрыв одной старой и образование единственной новой связи C—H,—простейшая модель NAD-зависимого дегидрирования карбонильных соединений. Она не осложнена стадиями переноса протона, а в организации переходного состояния участвует сравнительно небольшое число атомов [17, 18]. Следует отметить, что FDH метилотрофных бактерий *Pseudomonas* sp. 101 характеризуется относительно простой кинетической схемой. В отличие от большинства исследованных дегидрогеназ связывание субстратов (NAD и иона формата) этим ферментом происходит независимо друг от друга, а лимитирующей стадией реакции является непосредственно перенос гидрид-иона от субстрата к молекуле кофермента [19].

В данной работе использованы результаты, представленные в предыдущих статьях (аминокислотная последовательность [1] и трехмерная структура на уровне конформации полипептидной цепи [2]), с целью обсуждения структурной гомологии FDH метилотрофных бактерий *Pseudomonas* sp. 101 и ряда других NAD-зависимых дегидрогеназ и возможной роли некоторых аминокислотных остатков в катализе и поддержании нативной структуры фермента.

Организация субъединицы

Сравнение FDH с другими NAD-зависимыми дегидрогеназами, для которых известна первичная и пространственная структура (рис. 1), показывает, что по расположению доменов в полипептидной цепи FDH близка к алкогольдегидрогеназе печени лошади (LADH) и отличается от LDH, MDH и GPD.

В качестве отдельного структурного элемента NAD-зависимых дегидрогеназ можно выделить протяженную α -спираль, пространственно локализованную между каталитическим и коферментсвязывающим доменами. Отметим, что в FDH эта спираль (αA^* , остатки 147–164) занимает

* Обозначения элементов вторичной структуры см. в ссылках [6, 7] предыдущей статьи [2].

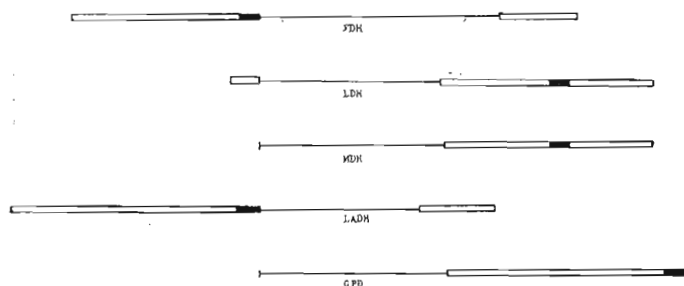


Рис. 1. Расположение доменов в полипептидной цепи NAD-зависимых дегидрогеназ. Линия — коферментсвязывающий домен, светлые прямоугольники — каталитический домен, темные — $\alpha A(\alpha 3G)$ -спираль

в аминокислотной последовательности белка место, приблизительно эквивалентное аналогичному элементу вторичной структуры LADH — спирали αA . В противоположность этому соответствующие α -спиральные участки LDH и MDH ($\alpha 3G$) располагаются в средней части каталитического домена, а в GPD представляет С-концевую структуру [3–7].

Доменная структура

Для сравнения топологии коферментсвязывающего домена FDH с аналогичными структурами в других дегидрогеназах (табл. 1) в соответствии с подходом Россмана и соавт. [7] были отобраны 26 C^α -атомов, входящих в состав β -листа коферментсвязывающего домена (βA - βF) и занимающих в структуре NAD-зависимых дегидрогеназ эквивалентные положения (использованные для сравнения аминокислотные остатки отмечены в рис. 2). В связи с тем что пространственная структура FDH была определена для ее тройного комплекса с коферментом и ингибитором, для сравнения дегидрогеназ между собой нами также были выбраны холоформы этих ферментов.

Среднеквадратичное отклонение для эквивалентных пар атомов при сравнении FDH с другими белками (табл. 1) несколько больше (от 1,2 до 1,6 Å), чем при сравнении этих дегидрогеназ между собой (от 0,9 до 1,3 Å). Это может быть вызвано, в частности, тем, что при расчете нами были использованы неуточненные координаты C^α -атомов FDH. Тем не менее данная процедура позволяет выделить консервативные участки в структуре белка и подчеркивает пространственную гомологию коферментсвязывающих доменов FDH и соответствующих доменов известных NAD-зависимых дегидрогеназ.

На рис. 3 представлено сравнение структуры коферментсвязывающего домена FDH с известными нуклеотидсвязывающими доменами NAD-зависимых дегидрогеназ. Принципиальным отличием строения коферментсвязывающего домена FDH от большинства соответствующих структур в других дегидрогеназах является наличие в составе его никотинамидсвязывающего участка дополнительного α - β -элемента (αG - βG), функция которого заключается в экранировании достаточно объемного активного

Таблица 1

Среднеквадратичное значение расстояний (Å) между 26 эквивалентными парами C^α -атомов при совмещении NAD- связывающих областей дегидрогеназ

Фермент	Источник	Лиганды	1	2	3	4	5
FDH	<i>Pseudomonas</i>	NAD+азид	*	1,55	1,33	1,26	1,16
LDH	Сердце свиньи	NAD+ α -лактат		*	1,12	1,11	1,29
LDH	Мышцы акулы	NAD+пируват			*	1,01	0,86
LADH	Печень лошади	ADPR				*	1,08
GPD	Омар	NAD					*

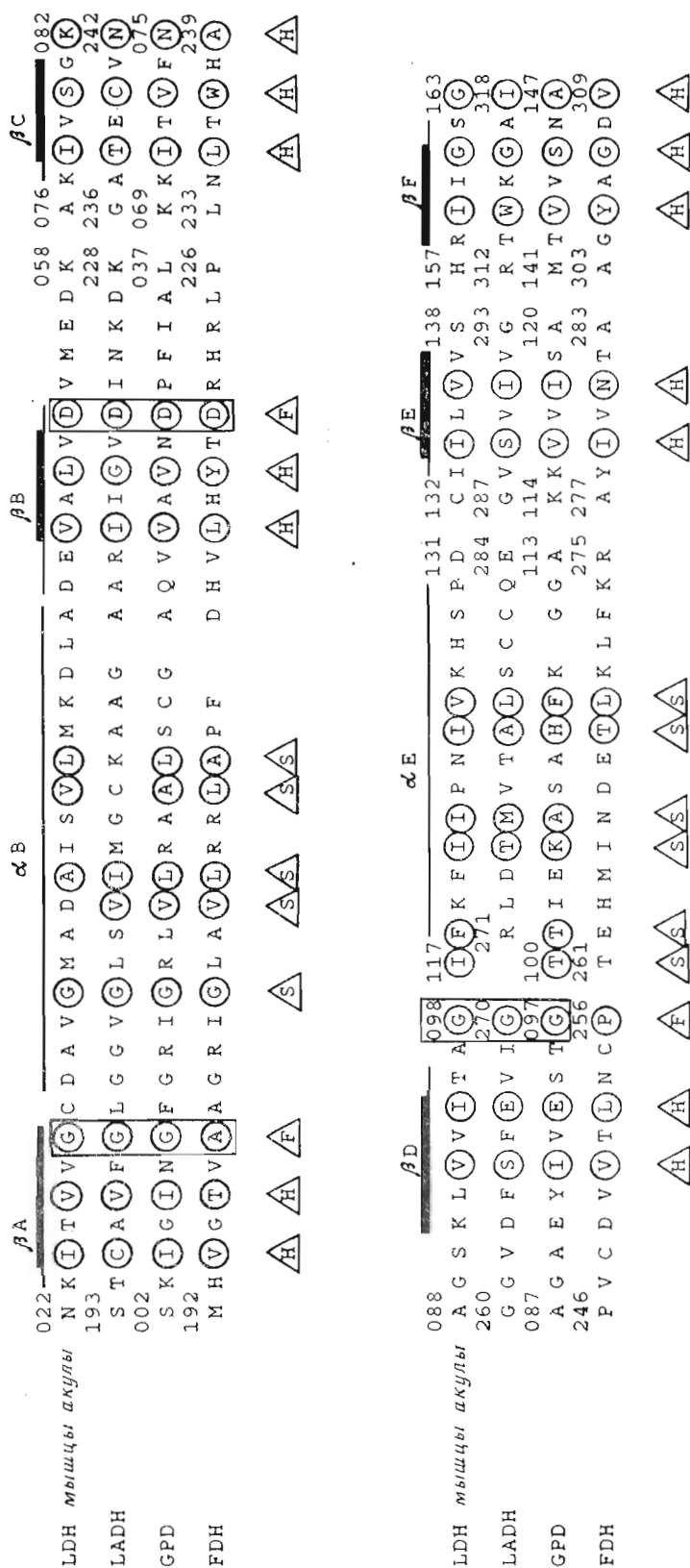


Рис. 2. Сравнение аминокислотных последовательностей NAD-зависимых дегидрогеназ в области коферментсвязывающего домена (в соответствии с работой [7]). Жирной чертой выделены 26 топологически эквивалентных аминокислотных остатков. Кругом обведены аминокислотные остатки, соответствующие: Н в треугольнике — боковая группа ориентирована в сторону β-листа, F в треугольнике — функционально консервативные аминокислотные остатки

центра фермента от растворителя. Возможно, присутствие дополнительной β G-цепи в структуре коферментсвязывающего домена FDN обусловлено стерическими причинами и связано с необычной субстратной специфичностью FDN *Pseudomonas* sp. 101. Как ранее сообщалось, FDN наряду с ионами формиата способна окислять ряд кислотных и тиоэфиров муравьиной кислоты, включая такую крупную молекулу, как S-формилглутатион [20].

В коферментсвязывающем домене FDN отсутствует элемент вторичной структуры, соответствующий дополнительной α D-спирали в составе LDH и MDH, которая принимает участие в конформационном изменении белка при связывании кофактора [21]. Однако не исключено, что роль так называемой подвижной петли, предшествующей α D-спирали в указанных дегидрогеназах и совершающей наиболее значительные перемещения при образовании холодокомплекса, в случае FDN может выполнять участок нерегулярной структуры, соединяющий β D-цепь с α E-спиралью (остатки 257–262).

Как уже отмечалось в предыдущей статье [2], топология каталитического домена FDN, в основе которой лежит параллельный β -лист, близка к структурному мотиву NAD-связывающего домена и принципиально отличается от структуры каталитических доменов других дегидрогеназ, для которых характерно сочетание элементов с антипараллельной β -структурой [3–6].

Таким образом, все пять структурно охарактеризованных к настоящему времени NAD-зависимых дегидрогеназ, включая FDN, имеют общее в целом строение коферментсвязывающего домена и различную топологию каталитических доменов.

Четвертичная структура

Ранее Россманом и соавт. [22] для описания четвертичной структуры LDH была предложена прямоугольная система координат PQR , оси которой совпадали с молекулярными осями симметрии второго порядка в молекуле белка. Каждой из этих осей были поставлены в соответствие межсубъединичные контакты в тетрамерной молекуле LDH. Позднее [23] аналогичная система координат была использована для описания четвертичной структуры GPD. Было показано, что в молекуле димерной MDH взаимодействие субъединиц аналогично Q -контакту в тетрамерных дегидрогеназах [24]. В связи с этим MDH была охарактеризована как « Q -димер», а тетрамерные LDH и GPD — как ассоциаты двух « Q -димеров» (рис. 4). Для другого известного димерного фермента (LADH) было найдено, что взаимодействие его субъединиц отличается от Q -кон-

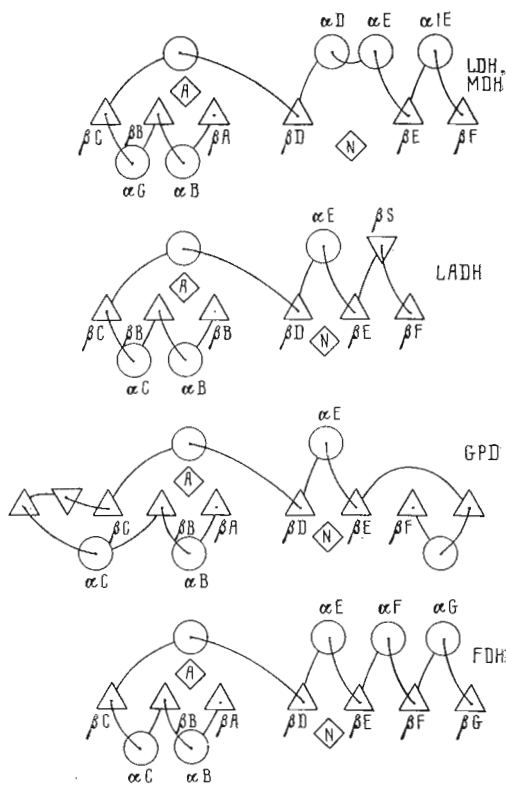


Рис. 3. Схематическое представление структуры коферментсвязывающего домена FDN и нуклеотидсвязывающих доменов в охарактеризованных NAD-зависимых дегидрогеназах [8]. Окружностями обозначены α -спирали, треугольниками — β -цепи, ромбами (A и N) — адениновый и никотинамидный фрагменты молекулы NAD.

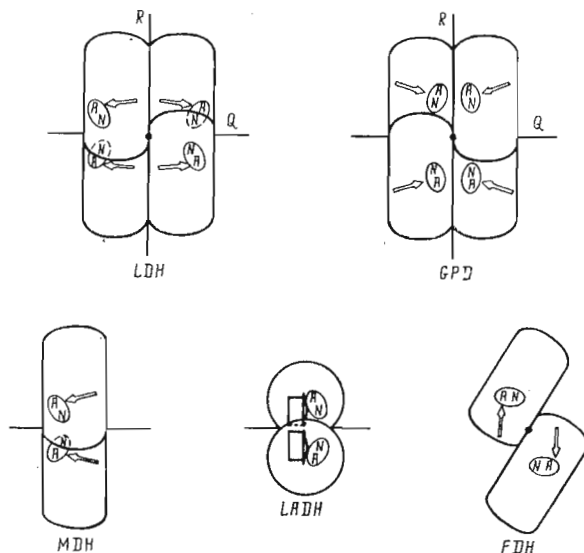


Рис. 4. Схематическое представление четвертичной структуры NAD-зависимых дегидрогеназ [7]. Стрелки обозначают направления β -листов коферментсвязывающих доменов

такта в MDH, в связи с чем был сделан вывод, что молекула LADH не является «Q-димером» [7]. Однако Бранденом и Эклундом [8] было отмечено, что ориентация коферментсвязывающих доменов LADH относительно молекулярной оси симметрии близка к таковой в LDH, GPD и MDH относительно Q-оси.

Для сравнения способов организации четвертичной структуры в различных NAD-зависимых дегидрогеназах систему координат PQR целесообразно поставить в соответствие с ориентацией β -листа коферментсвязывающего домена в субъединицах дегидрогеназ относительно их молекулярных осей симметрии.

Логично предположить, что ассоциация субъединиц в димер у дегидрогеназ может происходить по меньшей мере по трем различным направлениям — в соответствии с P , Q - или R -ориентацией. Следовательно, возможно существование трех различных типов димеров — P , Q и R . Ранее, как уже упоминалось, был найден только один тип димера, встречающийся в MDH, LDH и GPD, — так называемый Q-димер.

Аналогично MDH и LADH молекула FDN также является димером, однако способ ассоциации субъединиц у нее в корне отличается (рис. 4). В то время как при образовании димера в LADH формируется общий для всей молекулы 12-цепочечный β -лист, образованный двумя соседними β -листами коферментсвязывающих доменов, в FDN соответствующие β -листы располагаются параллельно друг другу, а межсубъединичные контакты осуществляются в направлении, перпендикулярном плоскостям β -листов.

В молекулах MDH и FDN в организации межсубъединичных контактов участвуют одни и те же элементы вторичной структуры — спирали αA ($\alpha 3G$), αB и αC . Однако если в молекуле MDH реализуются взаимодействия типа αC - $\alpha 3G'$, αB - $\alpha B'$, $\alpha 3G$ - $\alpha C'$ [23], в результате чего β -цепи обоих коферментсвязывающих доменов оказываются приблизительно коллинеарны Q -оси, то в FDN наблюдается контакт одноименных α -спиралей (αA - $\alpha A'$, αB - $\alpha B'$ и αC - $\alpha C'$), что приводит к антипараллельной ориентации β -цепей коферментсвязывающих доменов.

Если ассоциацию субъединиц в молекулу связывать с ориентацией молекулярных осей симметрии относительно β -листов коферментсвязывающих доменов, то, вероятно, должно наблюдаться соответствие между молекулярными осями симметрии в различных дегидрогеназах.

Значения углов (град) между молекулярными осями симметрии GPD и LDH при совмещении β -листов их коферментсвязывающих доменов *

LDH мышцы акулы	GPD		
	P	Q	R
P	23	69	82
Q	69	21	88
R	82	88	8

* В рамку заключены наименьшие значения углов между соответствующими молекулярными осями симметрии.

Таблица 3

Значения углов (град) между молекулярными осями симметрии димерных и тетрамерных NAD-зависимых дегидрогеназ при совмещении β -листов их коферментсвязывающих доменов *

Молекулярные оси симметрии	LDH мышцы акулы			LDH сердца свиньи			GPD		
	P	Q	R	P	Q	R	P	Q	R
FDH	23	95	67	25	90	65	21	75	76
LADH	84	27	64	87	22	69	81	28	63

* В рамку заключены наименьшие значения углов между соответствующими молекулярными осями симметрии.

Следуя предлагаемому подходу, нами были совмещены β -листы коферментсвязывающих доменов дегидрогеназ. В качестве реперов при совмещении β -листов использовали координаты 26 эквивалентных пар C^α -атомов (см. предыдущий раздел).

В табл. 2 приведено сравнение тетрамерных дегидрогеназ (LDH и GPD) между собой. Легко видеть, что различия в ориентации одноименных молекулярных осей симметрии не превышают $20-25^\circ$, что указывает на общность их четвертичной структуры. В табл. 3 проведено сравнение димерных молекул (LADH, FDH) с тетрамерными. Казалось бы, согласно представленным данным, к «Q-димерам» в соответствии с предлагаемой номенклатурой следует относить не только MDH, но и LADH, в то время как FDH представляет новый подкласс NAD-зависимых дегидрогеназ и является «P-димером». Однако заметим, что MDH была ранее охарактеризована как «Q-димер» главным образом в связи с тем, что в межсубъединичных контактах в этом белке принимают участие те же элементы вторичной структуры, что и в «Q-димерных» фрагментах LDH и GPD. В случае LADH ситуация иная, поэтому, основываясь на полученных нами результатах, более правильно характеризовать LADH не как «Q-димер», а как белок, субъединицы которого имеют «Q-ориентацию» относительно молекулярной оси симметрии. Соответственно в этих терминах FDH является «P-ориентированным» димером.

Логично поставить вопрос: являются ли полученные нами значения углов (табл. 2, 3) статистически достоверными? Расчет показывает, что при случайной ориентации молекулярной оси симметрии в системе координат PQR минимальные значения углов порядка $20-25^\circ$ могут наблюдаться лишь с вероятностью $20-30\%$. Это свидетельствует о высокой степени достоверности полученных результатов и означает, что за основу классификации четвертичных структур в дегидрогеназах действитель-

но может быть взята относительная ориентация β -листов коферментсвязывающих доменов.

Отметим участие в межсубъединичном взаимодействии FDN спиралей $\alpha 6$ и $\alpha 7$. Это обстоятельство, по-видимому, должно способствовать завершению формирования активных центров фермента путем образования контакта между коферментсвязывающим доменом одной субъединицы и каталитическим доменом другой. Молекулы кофермента в димере FDN достаточно далеко удалены друг от друга, что согласуется с моделью независимости активных центров этого фермента [25]. Минимальным расстоянием между молекулами NAD, находящимися на различных активных центрах, является расстояние между их никотинамидными фрагментами, которое составляет около 35 Å. Это больше, чем, например, в LDH (расстояние около 28 Å между центрами никотинамидных фрагментов в субъединицах, связанных *Q*-осью) или в GPD (21 Å между центрами адениновых фрагментов в субъединицах, связанных с *R*-осью).

Конформационные изменения

Как уже отмечалось, отличительной чертой NAD-зависимых дегидрогеназ являются глубокие конформационные изменения, происходящие с молекулой белка при связывании кофермента. Несмотря на то что в разных белках в этих изменениях принимают участие различные элементы вторичной структуры (например, подвижная петля коферментсвязывающего домена в LDH [24] или же целые домены, как в LADH [3, 26]), конечный результат структурных перестроек заключается в одном и том же — сужении субстратсвязывающей полости и экранировании активного центра фермента от растворителя. Предполагают, что подобного рода конформационные изменения — одна из наиболее важных особенностей каталитического механизма действия NAD-зависимых дегидрогеназ [9, 10].

Методом малоуглового рентгеновского рассеяния были зафиксированы значительные изменения геометрических параметров FDN при образовании двойных и тройных комплексов с коферментами и их аналогами [27, 28]. Было высказано предположение, что природа и степень этих конформационных изменений, обусловленных связыванием коферментов, определяется, с одной стороны, взаимодействием, реализующимся между белковой глобулой и ADPR-частью молекулы кофактора, а с другой — зарядом его никотинамидной группировки.

Тройной комплекс FDN с NAD и азидом (конкурентный по формату ингибитор фермента), являющийся гипотетическим аналогом переходного состояния реакции и структурно охарактеризованный в настоящей работе, согласно результатам, полученным с помощью малоуглового рентгеновского рассеяния, имеет геометрические параметры, характерные для так называемого закрытого состояния белковой глобулы [27, 28].

Представляет интерес уже на настоящем этапе исследований FDN попытаться выделить элементы структуры, ответственные за наблюдаемые конформационные изменения. Наиболее вероятными кандидатами на участие в конформационном изменении при образовании тройного комплекса, которое сопровождается, в частности, 5% уменьшением породовского объема белковой глобулы [27], являются спираль $\alpha 1$, принадлежащая каталитическому домену, и участок нерегулярной структуры коферментсвязывающего домена (остатки 257–262), занимающий в FDN положение, эквивалентное «подвижной» петле LDH. Оба этих фрагмента в тройном комплексе экранируют молекулу кофермента от воздействия растворителя (см. рис. 3 [2]).

На возможное участие указанных элементов вторичной структуры в конформационном переходе указывает и ряд косвенных данных. Как известно, FDN содержит шесть остатков цистеина, значительно различающихся (до трех порядков) по своей реакционной способности к 5,5'-дितिобис-2-нитробензоату (DTNB) [19]. Блокирование наиболее реакционноспособного из этих остатков модифицирующими реагентами — DTNB, иодацетамидом, *пара*-хлормеркурибензоатом, меркаптидной элект-

роуплотной меткой CNHg_4L_4 — приводит к потере ферментативной активности вследствие невозможности связывания кофермента [19, 29, 30].

Как показали исследования в растворе, функционально важный (существенный) остаток цистеина находится на конформационно подвижном участке полипептидной цепи и легко изменяет свою реакционную способность при различных воздействиях на белок, например, в результате специфической модификации некоторых аминокислотных остатков, таких, как гистидин или аргинин [31, 32]. Связывание коферментов и их аналогов защищает существенный цистеин от модификации, а фермент от инактивации [29].

Как в составе спирали $\alpha 1$, так и вблизи «петли» находятся остатки цистеина — Cys-5 и Cys-255 соответственно. Остальные четыре остатка цистеина (Cys-182, Cys-248, Cys-288 и Cys-354) расположены вдали от активного центра и вряд ли могут влиять на активность фермента. Побутно отметим, что молекула не содержит ни внутрисубъединичных, ни межузъединичных S—S-связей, а Cys-354 является одним из мест связывания метки при получении тяжелоатомных производных кристаллов FDH.

В тройном комплексе FDH—NAD—азид Cys-5 экспонирован в раствор, в то время как Cys-255, находящийся на расстоянии 8—10 Å от рибозных фрагментов и пирофосфатной группировки молекулы кофермента и на расстоянии 5—7 Å от центра аденинового фрагмента NAD, экранирован от растворителя и не должен быть доступен действию модифицирующего реагента. Однако ранее экспериментами с мечеными реагентами было установлено, что метка на основе иодацетамида селективно включается именно в Cys-255 [33], что подразумевает его доступность действию модифицирующего реагента в апобелке. Таким образом, с достаточно высокой степенью уверенности можно утверждать, что существенным тиолом FDH, контролирующим активность и стабильность фермента, является Cys-255 и что он располагается на конформационно подвижном участке активного центра или вблизи него (остатки 257—262). Последний в таком случае можно считать аналогом подвижной петли в LDH.

Можно предположить, что в апоферменте этот подвижный участок полипептидной цепи имеет иную конформацию и не экранирует Cys-255 и активный центр в целом со стороны растворителя. При образовании холомокомплекса подвижная петля перемещается, экранируя тем самым активный центр FDH, при этом Cys-255 становится недоступен для модификации. Учитывая то обстоятельство, что фермент с модифицированной сульфгидрильной группой теряет способность связывать молекулу NAD [29], можно предположить, что блокирование Cys-255 препятствует перемещению подвижной петли, а также непосредственно мешает связыванию кофермента в активном центре вследствие стерических препятствий. Более подробную информацию о роли остатка Cys-255 и всего сегмента (257—262) в механизме действия фермента можно будет получить, по-видимому, после проведения рентгеноструктурного анализа апоформы FDH.

Гомология первичной структуры

Сопоставление последовательностей NAD-зависимых дегидрогеназ не обнаруживает существенной степени идентичности даже между ферментами одного типа. В частности, при сравнении алкогольдегидрогеназы печени лошади с ферментом дрожжей число аминокислотных замен составляет около 75% и лишь для сравнительно небольших сегментов полипептидной цепи понижается до 65—60% [34]. Гомология NAD-зависимых дегидрогеназ остается невысокой и при условии совмещения гомологичных элементов вторичной структуры [7]. Например, число аминокислотных замен на 100 остатков при сравнении последовательностей коферментсвязывающих доменов дегидрогеназ, которые, как уже отмечалось, характеризуются высоким консерватизмом пространственного строения, составляет от 30—40 для белков одного типа (GPD) до 70—80 при сравнении различных белков.

Число аминокислотных замен на 100 остатков при сравнении последовательностей NAD-зависимых дегидрогеназ в области коферментсвязывающего домена

№	Фермент	Источник *	№				
			1	2	3	4	5
1	FDH	Сердце свиньи Мышцы акулы	*	88	92	89	82
2	LDH			*	27	85	82
3	LDH				*	84	80
4	LADH					*	84
5	GPD						*

* См. табл. 1.

Таблица 5

Консервативные аминокислотные остатки в активных центрах NAD-зависимых дегидрогеназ [9], взаимодействующие с фрагментами NAD

Фрагмент молекулы NAD	LDH	LADH	GPD	Место расположения остатка в структуре белка
Адениновая рибоза	Gly-28 Asp-53	Gly-199 Asp-223	Gly-7 Asp-32	Конец β A Конец β B
Никотинамидная рибоза	Gly-99	Gly-270	Gly-97	Конец β D

Поиск по банку данных [14] не обнаружил существенной гомологии последовательности каталитического домена FDH с известными структурами. На рис. 2 поэтому представлено лишь сопоставление первичной структуры коферментсвязывающей области FDH с соответствующими структурными элементами некоторых других дегидрогеназ. При сравнении последовательностей учитывалось положение топологически эквивалентных пар атомов в β -цепях FDH, а также направление боковых заместителей аминокислотных остатков, локализованных на α -спиралях, ориентированных по направлению к β -листу.

Так же как и другие NAD-зависимые дегидрогеназы, FDH характеризуется низкой степенью идентичности аминокислотных остатков даже при сравнении топологически сходных элементов вторичной структуры (табл. 4).

Сорбция NAD в активном центре дегидрогеназ обусловлена взаимодействием молекулы кофактора с рядом аминокислотных остатков коферментсвязывающего домена. Считается, что в общей сложности не менее 25–30 боковых групп полипептидных цепей дегидрогеназ образуют связи с различными фрагментами молекулы кофермента [3–10]. Однако три аминокислотных остатка (два глицина и один остаток аспарагиновой кислоты) во всех до сих пор структурно охарактеризованных дегидрогеназах взаимодействуют с одними и теми же фрагментами NAD и являются консервативными (табл. 5). Роль остатков глицина заключается в обеспечении тесного контакта молекулы NAD с коферментсвязывающим доменом. Эти остатки располагаются на изломах полипептидной цепи, и наличие у них любой боковой группы, кроме атома водорода, вызвало бы стерические препятствия при сорбции NAD в активном центре [3–10]. Остаток аспарагиновой кислоты, взаимодействуя с 2'-ОН-группой адениновой рибозы, ответствен за специфичность данного фермента к NAD и NADP. Отсутствие данного взаимодействия приводит к слабому связыванию NAD и потере его правильной ориентации. На примере 2'-дезоксинад это показано в работе [35].

В случае FDH (рис. 2) из трех упомянутых консервативных остатков сохраняется лишь один — Asp-224, локализованный на конце β B-цепи и ориентированный в сторону адениновой рибозы молекулы NAD. Сле-

дует отметить, что ранее методами химической модификации было обнаружено, что в молекуле апо-FDH имеется по меньшей мере один существенный для связывания кофермента карбоксильный остаток, блокирование которого приводит к потере ферментативной активности [36]. Авторы полагали, что этот аминокислотный остаток может быть консервативным остатком аспарагиновой кислоты в активном центре FDH.

В соответствии с проведенным нами анализом место одного из предполагаемых остатков глицина в молекуле FDH занимает Ala-198, а на месте другого расположен Pro-256 (рис. 2).

Пирофосфатная часть кофактора в FDH, как и в других NAD-зависимых дегидрогеназах, локализована в месте контакта двух моонуклеотидсвязывающих субдоменов коферментсвязывающей области активного центра. Синтез электронной плотности свидетельствует о возможности взаимодействия пирофосфатной группировки молекулы NAD с остатком Arg-201, который находится на α B-спирали. Остатки аргинина, участвующие в связывании пирофосфата, были ранее обнаружены в LADH (Arg-47 и Arg-369) и LDH (Arg-102) [9]. Заметим, что наличие на коферментсвязывающем участке активного центра FDH остатка аргинина, существенного для связывания кофактора, было предположено ранее на основании экспериментов по химической модификации FDH [32].

Таким образом, несмотря на присущий FDH, как и в целом другим NAD-зависимым дегидрогеназам, высокий консерватизм пространственной структуры коферментсвязывающего домена, в ней сохраняется характерное пространственное расположение лишь одного из трех консервативных аминокислотных остатков. Причины замены в FDH ранее считавшихся инвариантными для NAD-зависимых дегидрогеназ остатков глицина на более объемные аминокислотные остатки, каковыми являются аланин и пролин, пока недостаточно ясны. При данном уровне рентгеноструктурного разрешения можно лишь утверждать, что эти замены не приводят к существенной деформации β -слоя коферментсвязывающего домена в FDH.

Уже на настоящем этапе структурных исследований FDH оказалось возможным провести определенные корреляции со свойствами фермента в растворе, в частности с данными по химической модификации белка специфическими реагентами. Выявлено местоположение существенного типа FDH (Cys-255) и высказано предположение о роли его ближайшего окружения в конформационных изменениях фермента в процессе катализа. Ранее картированные в составе активного центра FDH существенные остатки аргинина и карбоксильная группа, по-видимому, могут быть отнесены к Arg-201 и Asp-221 соответственно.

Дальнейшее уточнение структуры FDH даст информацию о положении боковых заместителей аминокислотных остатков и позволит выяснить тонкие детали организации активного центра и перейти к формулировке молекулярного механизма действия фермента.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Попов В. О., Шумилин И. А., Устинникова Т. Б., Ламзин В. С., Егоров Ц. А. // Биоорг. химия. 1990. Т. 16. № 3. С. 324–335.
2. Ламзин В. С., Алешин А. Е., Шумилин И. А., Устинникова Т. Б., Егоров Ц. А., Аргунян Э. Г., Попов В. О. // Биоорг. химия. 1990. Т. 16. № 3. С. 336–344.
3. Branden C.-I., Jonvall H., Eklund H., Furugren B. // The Enzymes/Ed. Boyer P. D. N. Y.: Acad. Press, 3ed ed. 1975. V. 11. Part A. P. 103–190.
4. Holbrook J., Liljas A., Steindel S. J., Rossmann M. G. // The Enzymes/Ed. Boyer P. D. N. Y.: Acad. Press, 3ed ed. 1975. V. 11. Part A. P. 191–292.
5. Banaszak L. J., Brandshaw R. A. // The Enzymes/Ed. Boyer P. D. N. Y.: Acad. Press, 3ed ed. 1975. V. 11. Part A. P. 369–396.
6. Harris J. I., Waters M. // The Enzymes/Ed. Boyer P. D. N. Y.: Acad. Press, 3ed ed. 1975. V. 11. Part B. P. 1–49.
7. Rossmann M. G., Liljas A., Branden C.-I., Banaszak L. J. // The Enzymes/Ed. Boyer P. D. N. Y.: Acad. Press, 3ed ed. 1975. V. 11. Part A. P. 61–102.
8. Branden C.-I., Eklund H. // Dehydrogenases Requiring Nicotinamid Coenzymes/Ed. Jeffery J. Basel: Birkhauser, 1980. P. 41–84.
9. Grau U. M. // Pyridine Nucleotide Coenzymes/Eds Everse J., Anderson B., You K.-S. N. Y. — L.: Acad. Press, 1982. P. 135–187.

10. Eklund H., Branden C.-I. // Pyridine Nucleotide Coenzymes/ Eds Dolphin D. N. Y.: Wiley, 1987. P. 51-98.
11. Dalziel K. // The Enzymes/Ed. Boyer P. D. N. Y.: Acad. Press, 3ed ed. 1975. V. 11. Part A. P. 1-60.
12. Rice D. W., Parker P. J., Farrantz G. W., Hornby D. P. // Biochem. J. 1987. V. 242. № 3. P. 789-795.
13. Hones J., Jany K. D., Pflleiderer G., Wagner A. F. V. // FEBS Lett. 1987. V. 212. № 2. P. 193-198.
14. Protein Identification Resource. 11.0 release. Dec. 1986.
15. Parker D. M., Holbrook J. // Pyridine Nucleotide-Dependent Dehydrogenases/Ed. Sund H. Berlin: de Gruyter, 1977. P. 485-501.
16. Akhtar M., Jones C. // Tetrahedron. 1977. V. 36. P. 813-832.
17. Blanchard J. S., Cleland W. W. // Biochemistry. 1980. V. 19. № 18. P. 3543-3550.
18. Hermes J. D., Morrical S. W., O'Leary M. H., Cleland W. W. // Biochemistry. 1984. V. 23. № 23. P. 5479-5488.
19. Egorov A. M., Popov V. O., Berezin I. V., Rodionov Yu. V. // J. Solid. Phase Biochem. 1980. V. 65. № 1. P. 19-33.
20. Тишков В. И., Егоров А. М., Попов В. О. // Биохимия. 1983. Т. 48. № 7. С. 1172-1180.
21. White J. L., Hackert M. L., Buehner M., Adams M. G., Ford G. C., Lentz P. J., Smiley I. L., Steindel S. J., Rossmann M. G. // J. Mol. Biol. 1976. V. 102. № 4. P. 759-779.
22. Rossmann M. G., Adams M. J., Buehner M., Ford G. C., Hackert M. L., Liljas A., Rao S. T., Banaszak L. J., Hill E., Tsernoglou D., Webb L. // J. Mol. Biol. 1973. V. 76. № 4. P. 533-537.
23. Buehner M., Ford G. C., Moras D., Olsen K. W., Rossmann M. G. // J. Mol. Biol. 1974. V. 90. № 1. P. 25-49.
24. Rao S. T., Rossmann M. G. // J. Mol. Biol. 1973. V. 76. № 2. P. 241-256.
25. Попов В. О., Родионов Ю. В., Егоров А. М., Березин И. В. // Докл. АН СССР. 1978. Т. 239. № 6. С. 1482-1485.
26. Eklund H., Branden C.-I. // J. Biol. Chem. 1979. V. 254. № 9. P. 3458-3461.
27. Ламзин В. С., Асадчиков В. Е., Попов В. О., Егоров А. М., Березин И. В. // Докл. АН СССР. 1986. Т. 291. № 4. С. 1011-1014.
28. Asadchikov V. E., Lamzin V. S., Egorov A. M., Popov V. O. // Studia Biophys. 1986. V. 112. № 2-3. P. 197-200.
29. Попов В. О., Егоров А. М. // Биохимия. 1979. Т. 44. № 2. С. 207-213.
30. Попов В. О., Егоров А. М., Ламзин В. С., Могилевский Л. Ю., Попов В. О. // Кристаллография. 1985. Т. 30. Вып. 6. С. 1102-1106.
31. Попов В. О., Родионов Ю. В., Егоров А. М., Березин И. В. // Биохимия. 1978. Т. 43. № 7. С. 1212-1221.
32. Egorov A. M., Tishkov V. I., Popov V. O., Berezin I. V. // Biochim. et biophys. acta. 1981. V. 659. № 1. P. 141-149.
33. Устинникова Т. Б., Попов В. О., Егоров И. А. // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. № 7. С. 905-909.
34. Jornvall H. // Dehydrogenases Requiring Nicotinamid Coenzymes/Ed. Jeffery J. Basel: Birkhauser, 1980. P. 126-148.
35. Suhadolnic R. J., Lennon M. B., Nematsu T., Monahan J. E., Baur R. // J. Biol. Chem. 1977. V. 252. № 12. P. 4125-4133.
36. Тишков В. И., Егоров А. М., Попов В. О. // Биоорган. химия. 1984. Т. 9. № 10. С. 1341-1347.

Поступила в редакцию
4.IV.1989

V. S. LAMZIN, A. E. ALESHIN*, I. A. SHUMILIN, T. B. USTINNIKOVA,
Ts. A. EGOROV**, E. H. HARUTYUNYAN*, V. O. POPOV

NAD-DEPENDENT FORMATE DEHYDROGENASE FROM METHYLOTROPHIC BACTERIUM *PSEUDOMONAS* sp. 101. III. THE COMPARATIVE ANALYSIS

*A. N. Bach Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the USSR,
Moscow;*

* *A. V. Shubnikov Institute of Crystallography, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow;*

** *N. I. Vavilov Institute of General Genetics, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow*

The comparative analysis of the primary and tertiary structures of NAD-dependent bacterial formate dehydrogenase (FDH) from methylotrophic bacterium *Pseudomonas* sp. 101 and a number of structurally characterized NAD-dependent dehydrogenases were performed. FDH has a highly conservative fold of the coenzyme binding domain. Posi-

tion of the symmetry axis in the FDH molecule relative to the β -sheets of its coenzyme binding domain with the respective sequences of the other NAD-dependent enzymes was performed on the basis of the spatial homology between these structures. Only one of the three amino acid residues previously thought to be conserved in the coenzyme binding domains of NAD-dependent dehydrogenases is preserved in the FDH molecule (Asp-221). Two glycine residues found in all previously studied dehydrogenases are substituted in FDH by Ala-198 and Pro-256, respectively. Position of the essential thiol of FDH (Cys-255) in the protein structure was established. It is suggested that Cys-255 is situated on or near polypeptide locus taking part in the conformational changes of the protein in the course of the catalysis.