

Кинетический механизм рекомбинантной формиатдегидрогеназы из *Arabidopsis thaliana*, экспрессированной в клетках *E.coli*

Войнова Н.С.¹, Тишков В.И.^{1,2}

студент 4 курса

¹Химический факультет МГУ им.М.В.Ломоносова, 119992 Москва

²ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», 109559, Москва

E-mail: vojnovanatalya@gmail.com

Arabidopsis thaliana обладает наименьшим по размеру геномом среди растений. Определение последовательностей хромосом ряда высших растений показало, что обязательным компонентом всех растений является NAD⁺-зависимая формиатдегидрогеназа (ФДГ, КФ 1.2.1.2.). В силу простоты строения генома наибольшей популярностью пользуется фермент *Arabidopsis thaliana*. Белковый состав митохондрий свидетельствует, что ФДГ локализуется именно в них. Этот фермент играет важную роль в ответе на стрессовые воздействия в растениях. Он окисляет образующийся в результате стресса формиат и восстанавливает NAD⁺ до NADH.

До настоящего времени никому в мире не удалось экспрессировать ФДГ из растений в клетках *E.coli* в активной и растворимой форме, и попытки экспрессии заканчивались образованием телец включения. В нашей лаборатории были созданы генно-инженерные конструкции, позволившие получить в клетках *E.coli* рекомбинантные ФДГ из растений *Arabidopsis thaliana* в активной и растворимой форме. Нами были выделены гомогенные препараты рекомбинантной ФДГ из *A.thaliana*, и изучен кинетический механизм и термостабильность ФДГ.

В данной работе представлены результаты изучения кинетических свойств рекомбинантной ФДГ из *A.thaliana*. Кинетический механизм был определен методом стационарной кинетики по начальным скоростям реакции. Для этого анализировались зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации одного из субстратов, NAD⁺, при фиксированных концентрациях формиата. Полученные данные в двойных обратных координатах представляли собой набор прямых, пересекающихся в одной точке. Таким образом, ферментативная реакция в случае этого фермента включает образование тройного фермент-субстратного комплекса. Затем были построены вторичные зависимости отсекаемого отрезка и тангенса угла наклона прямых от обратной концентрации формиата. С их помощью были найдены следующие кинетические параметры: максимальная скорость ферментативной реакции V_{max} , константа Михаэлиса по формиату K_M^F и NAD⁺ K_M^N и смешанная константа K_{NF} .

Также было изучено действие одного из наиболее сильных ингибитора ФДГ – азида. Оказалось, что в данном случае реализуется случай полного конкурентного ингибирования. Найденная константа ингибирования K_i составила $1 \cdot 10^{-7}$ М, что согласуется со значением этой константы для бактериальной ФДГ.

Работа выполнена в рамках проекта РФФИ 05-04-49073