

CHARAKTERIZÁCIA VLASTNOSTÍ A KRYŠTALIZÁCIA MALÁTDEHYDROGENÁZY *Streptomyces coelicolor* A3 (2)

DARINA MIKULÁŠOVÁ, MICHAELA
KOHÁRYOVÁ, PETRA ŠTEFANKOVÁ
a MARTA KOLLÁROVÁ

Katedra biochémie, Prírodovedecká fakulta UK, Mlynská
dolina CH1, 842 15 Bratislava, Slovenská republika
mikulaso@fns.uniba.sk, koharyova@fns.uniba.sk,
kollarm@fns.uniba.sk

Došlo 28.1.01, prijaté 10.2.10.

Kľúčové slová: malátdehydrogenáza (MDH), *Streptomyces coelicolor*, kryštalizácia

Úvod

Veľká časť bakteriálnych malátdehydrogenáz (MHD) je špecifická na koenzým NADH. Výnimku tvorí MDH *Corynebacterium glutamicum*¹ a niektorí zástupcovia z rodu *Bacillus*². MDH zo *Streptomyces aureofaciens* vykazuje vysokú špecifitu pre koenzým NAD(H) a s koenzýmom NADP(H) je takmer neaktívna³. Pre lepšie porozumenie koenzýmovej špecifity v NAD-závislej MDH z *Thermus flavus* AT-62 (tMDH) bola vyriešená jej kryštalová štruktúra v komplexe s NADP(H) s rozlíšením 1,65 Å. Táto štruktúra je takmer rovnaká ako v komplexe s NADH. NADP(H) sa viaže na tMDH v opačnej orientácii, kde adenín obsadzuje pozíciu vedľa katalytického miesta a nikotínamid sa viaže do adenín-viažuceho miesta komplexu tMDH-NADH. Toto bol prvý dôkaz alternatívne viažuceho nikotínamidového koenzýmu s tzv. pseudosymetriou v jeho štruktúre⁴.

Štúdium malátdehydrogenáz z ríše Archaea poukázalo na variabilitu ich koenzýmovej špecifity. Špecifitou voči obom koenzýmom – NAD(H) aj NADP(H) sa vyznačuje MDH z hypertermofilnej metanogénnej archaeobaktérie *Methanothermobacter fervidus*⁵. Vyššia afinita ku koenzýmu NADP(H) bola preukázaná tiež stanovením aktivity MDH pochádzajúcej z *Methanococcus jannaschii*. Táto preferencia je vysvetľovaná prítomnosťou glycinu (Gly33) v kofaktor-viažúcom mieste, kde sa väčšinou u iných NAD-závislých malátdehydrogenáz nachádza konzervovaný aspartát alebo glutamát⁶.

Eukaryotické malátdehydrogenázy sú NAD(H)-závislé s výnimkou chloroplastovej svetlom aktivovanej NADP(H)-závislej MDH⁷. Muslin a spol. zamenili dve aminokyseliny v NAD(H)-závislej MDH z *E. coli* za cysteíny, čím vytvorili redox-senzitívny enzým. Oxidáciou cysteínov v uzamknutej doméne mutantného enzýmu tak

fahko napodobnili inaktiváciu tmou redox-senzitívnej chloroplastovej dehydrogenázy⁸.

Predpokladáme, že vyriešenie 3D kryštálovej štruktúry MDH zo *Streptomyces coelicolor* A3(2) umožní definovať koenzýmovú špecifitu tejto grampozitívnej baktérie. Z tohto dôvodu sme pristúpili k príprave nadprodukčného kmeňa MDH a k stanoveniu podmienok kryštalizácie tohto proteínu.

Materiál a metódy

Bakteriálne kmene, plazmidy a kultivačné podmienky

Spóry kmeňa *Streptomyces coelicolor* A3 (2) sme získali darom od prof. D. A. Hopwooda. Spóry boli kultivované podľa Hopwooda a spol.⁹ a použité na purifikáciu MDH. Na klonovanie génu *mdh* boli použité bakteriálne kmene *E. coli* MM294 (F⁺, endAJ, hsd17 (rk⁻, mk) supE44, thi⁻¹), ktoré boli kultivované podľa Ausubel a spol.¹⁰. Na klonovanie a expresiu bol použitý plazmid pET-15b (Novagen, USA) s *T7lac* promótorom a *N*-terminálnou His.Tag sekvenciou s následným štiepnym miestom pre trombín. Pre nadexpresiu MDH bol použitý kmeň *E. coli* BL21 (DE3) (F⁻, omp T, hsd_B, (r⁻_B), gal, dcm (DE3)) (Novagen, USA). Bunky *E. coli* obsahujúce plazmid pET-15b rástli na LB médiu s 100 µg ml⁻¹ ampicilínom.

Amplifikácia, klonovanie a expresia

Gén *mdh* zo *S. coelicolor* bol amplifikovaný reakciou PCR použitím genómovej DNA *S. coelicolor* A3(2) ako templátu, izolovanej podľa protokolu Hopwood a spol.⁹ Na reakciu boli navrhnuté oligonukleotidové primery 5'-ggattccatgatgactgcactcccgtaa-3' a 5'-cgcgatcctcagatgagccgagaccg-3'. Primery boli navrhnuté tak, aby obsahovali restriktčné miesta NdeI a BamHI (podčiarknuté) umožňujúce priame klonovanie PCR produktu do príslušného miesta nachádzajúcom sa na plazmide pET-15b (Novagen). Rekombinantným plazmidom pET-15b-*mdh* boli transformované bunky *E. coli* BL21(DE3). Tento kmeň, použitý na nadprodukciiu MDH bol označený *E. coli* IB831. Kultúra buniek narastená do OD₆₀₀ 0,5–0,7 bola indukovaná IPTG (izopropyl-β-tiogalaktosid) do výslednej koncentrácie 1mM. Indukcia trvala 3 hodiny pri teplote 37 °C. Bunky boli usadené centrifugáciou a pelety uskladnené pri teplote –20 °C.

Purifikácia rekombinantnej malátdehydrogenázy a odštiepenie His.Tag sekvencie

Pelety buniek *E. coli* IB831 boli rozsuspendované v roztoku obsahujúcom 100 mM Tris-HCl pH 8,0 a 2 mM EDTA a sonikované použitím Soniprep 150 (MSE, Crawley, UK). Cytoplazmatickú frakciu s nadprodukovanou MDH sme získali po ultracentrifugácii pri 39 000 g použi-

tím ultracentrifúgy Beckman L8-50M/E (Beckman PA, CA, USA). Supernatanty boli aplikované na špecifické chelatačné kolóny His.Bind Resin (Novagen, USA). Po vyplavení nešpecifických proteínov a zvyšovaním koncentrácie imidazolu v rozmedzí od 100 do 400 mM boli postupne eluované rekombinantné bielkoviny. Všetky frakcie boli analyzované na 12% SDS-PAGE géloch a farbené Coomassie Brilliant Blue R-250 (cit.¹¹) alebo striebrom¹². His.Tag sekvencia rekombinantnej MDH bola odštiepená biotinylovaným trombínom (Novagen) pri teplote 20 °C (1 ml reakčnej zmesi obsahoval 800 µg rekombinantného proteínu a 1U biotinylovaného trombínu v tlmivom roztoku). Biotinylovaný trombín bol odstránený streptavidín agarózou a MDH bez His.Tag sekvencie bola izolovaná opäť použitím kolóny His.Bind Resin (Novagen). Takto sme pripravili vzorku MDH s koncentráciou 8 mg ml⁻¹, ktorú sme predialyzovali do kryštalizačného roztoku zloženého z 10 mM Tris-HCl pH 7,5 a 1 mM DTT.

Purifikácia MDH z kmeňa *S. coelicolor* A3(2)

Všetky manipulácie boli vykonávané pri teplote 4 °C. Celkovo 70 g buniek *S. coelicolor* A3 (2) bolo rozsuspenzovaných v 100 ml tlmivého roztoku A obsahujúcom: 20 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,1 mM EDTA; 50 mM 2-merkaptóetanol, 0,05 mM PMSF, disruptovaných použitím Soniprep 150 (MSE, Crawley, UK). Zvyšky buniek z homogenátu boli odstránené centrifugáciou 10 min pri 2000 g a supernatant bol centrifugovaný 15 min pri 10 000 g. Nukleové kyseliny boli precipitované z hrubého extraktu pomalým pridávaním čerstvo pripraveným 20% (w/v) streptomycín sulfátom do celkovej koncentrácie 0,75 % (w/v). Po 1 hodinovom zrážaní bola zrazenina odstránená 20 min centrifugáciou pri 10 000 g. Všetky nasledujúce centrifugácie boli prevedené rovnako. Pevný síran amónny bol pridaný k supernatantu do 30% nasýtenia. Po 30 minútovom zrážaní sa zrazenina odstránila centrifugáciou a ďalší síran amónny bol pridaný do 80% (w/v) nasýtenia. Po 30 minútovom zrážaní boli proteíny usadené centrifugáciou. Pellet, ktorý obsahoval MDH, bol rozsuspenzovaný v tlmivom roztoku B obsahujúcom: 20 mM fosfátový tlmivý roztok pH 7,0; 1 mM EDTA; 50 mM 2-merkaptóetanol a dialyzovaný cez noc oproti 2 l tohto roztoku. Vzorka po dialýze bola nanosená na kolónu DE-AE celulózy DE-52 (Whatman, 2×20 cm) ekvilibrovanú tlmivým roztokom B. Proteíny boli eluované 150 ml gradientom 20–500 mM fosfátovým tlmivým roztokom B. Aktívne frakcie boli zbierané a dialyzované cez noc oproti 1 l tlmivého roztoku C obsahujúcom 10 mM fosfátový tlmivý roztok pH 6,8 a 25% síran amónny. Frakcie s aktivitou pre MDH boli nanosené na kolónu Phenyl Sepharose CL 4B (Pharmacia, 0,7×17 cm) ekvilibrovanú tlmivým roztokom C. Proteíny boli eluované 50 ml lineárnym gradientom s obsahom 0–50 % etylénglykolu v tlmivom roztoku C. Aktívne frakcie boli dialyzované cez noc oproti 250 ml tlmivého roztoku D (20 mM fosfát sodný pH 7,2). Dialyzovaný extrakt bol nanosený na kolónu Matrex Red

A (Sigma, 0,7×15 cm) ekvilibrovanú tlmivým roztokom D. Všetky frakcie boli analyzované 12% SDS-PAGE elektroforézou a farbené Coomassie Brilliant Blue R-250 (cit.¹¹) alebo striebrom¹². Spojené aktívne frakcie boli zakonzentrované do kryštalizačného tlmivého roztoku (10 mM Tris-HCl pH 7,5 a 1 mM DTT) na koncentráciu 8 mg ml⁻¹.

Stanovenie aktivity malátdehydrogenázy

Jednotka aktivity malátdehydrogenázy zodpovedá oxidácii 1 µmol NAD(P)H za minútu meraním v 1ml kyvete obsahujúcej reakčnú zmes: 100 mM Tris-HCl tlmivý roztok pH 8,0, 765 µM kyselina oxaloctová, 230 µM NADH alebo 200 µM NADPH a príslušné množstvo MDH. Oxidácia NAD(P)H bola sledovaná pri 30 °C na spektrofotometri HITACHI U-2001.

Kryštalizácia

Kryštály oboch malátdehydrogenáz boli získané kryštalizáciou vo visiacej kvapke pri 19 °C. Na kryštalizáciu boli použité dva komerčne dostupné skríningové sety (Hampton Research Screen 1, Hampton Research screen 2) a laboratórne pripravené kryštalizačné zmesi.

Výsledky a závery

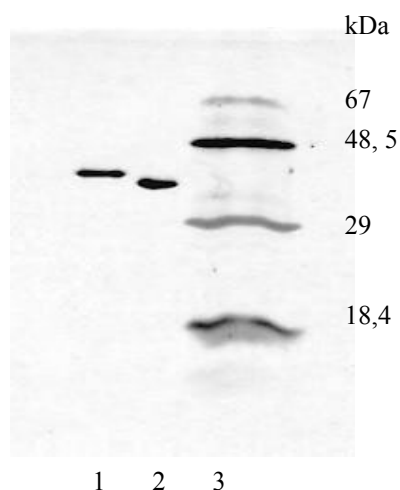
Z rekombinantného kmeňa *E. coli* IB831 bola izolovaná MDH *S. coelicolor* A3(2). Izolovaná rekombinantná MDH so sekvenciou His.Tag bola použitá na predbežný kryštalizačný skríning v dvoch komerčne dostupných setoch. Vo visiacej kvapke nenarástli žiadne kryštály na rozdiel od natívneho proteínu, čoho príčinou mohla byť His.Tag sekvencia na proteíne. Preto sme sa rozhodli túto sekvenciu z MDH odstrániť biotinylovaným trombínom (obr. 1) a zopakovať kryštalizačný skríning. Účinnosť purifikácie je znázornená v tab. I.

Ihličkovité kryštály narástli vo visiacej kvapke bez koenzýmu v roztoku obsahujúcom 0,1 M Na-citrátový tlmivý roztok pH 5,6; 0,2 M octan amónny; 80 µM kyselinu oxaloctovú a 27% (w/v) PEG 4000 (obr. 2A), štvorcové kryštály narástli vo visiacej kvapke v roztoku obsahujúcom 0,1 M Na-citrátový tlmivý roztok pH 5,4; 0,2 M octan amónny, 26% (w/v) PEG 4000 s koenzýmom NADH (obr. 2B) a v roztoku obsahujúcom 0,1 M Na-citrátový tlmivý roztok pH 6,0; 0,2 M octan amónny, 27% (w/v) PEG 4000 s koenzýmom NADH (obr. 2C). Rôznorodé kryštály vznikli v troch roztokoch: 1) v 0,1 M Na-citrátovom tlmivom roztoku pH 6,0; 0,2 M octane amónnom; 26% (w/v) PEG 4000 s koenzýmom NADPH, 2) 0,1 M Na-citrátovom tlmivom roztoku pH 6,0; 0,2 M octane amónnom; 27% (w/v) PEG 4000 s koenzýmom NADH a 3) 0,1 M Na-citrátovom tlmivom roztoku pH 6,0; 0,2 M octane amónnom; 23% (w/v) PEG 4000 bez koenzýmu (obr. 2D–F).

Tabuľka I

Purifikácia rekombinantnej MDH *S.coelicolor* A3(2) bez His.tag sekvencie

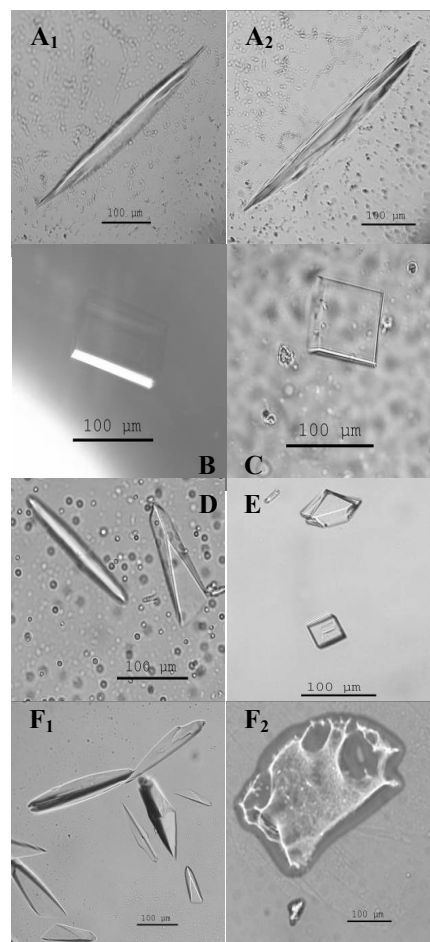
Frakcia	Objem [ml]	Proteíny celkovo [mg]	Celková aktivita [U]	Špecifická aktivita [U mg ⁻¹]	Výtťažok [%]	Purifikačný faktor
Bunkový extrakt	11.5	27.6	4335	157	100	1
MDH bez His.Tag sekvencie	14	2.5	2465	986	57	6.3



Obr. 1. Purifikácia rekombinantnej MDH *S.coelicolor* A3(2) bez His.tag sekvencie. SDS-PAGE (12 % w/v). Dráha č. 1: rekombinantná MDH po izolácii na kolóne His.Bind Resin, dráha č. 2: rekombinantná MDH po odstránení His.Tag sekvencie, dráha č. 3: proteinové štandardy: hovädzi sérum albumín (M_r 67 000), fumaráza (M_r 48 500), anhydráza kyseliny uhličitej (M_r 29 000), β -laktoglobulín (M_r 18 400)

Ihličkovité kryštály starli (obr. 2A₁, A₂), boli nestabilné a dochádzalo k ich rozpúšťaniu a postupnej degradácii (obr. 2F₂). Preto sme sa rozhodli izolovať a kryštalizovať MDH z natívneho kmeňa *S. coelicolor* A3(2). Účinnosť purifikácie je znázornená v tab. II. V porovnaní s izoláciou MDH z nadproduktých kmeňov je izolácia z pôvodného kmeňa použitím streptomycínsulfátového zrážania menej efektívna, ale ionoménichová chromatografia na DEAE celulóze DE-52 a hydrofóbne interakcie na kolóne Phenyl Sepharózy CL4B zvyšujú purifikačný faktor. Homogénna MDH bola získaná po afinitnej chromatografii na Red 120 agaróze (obr. 3) a použitá na kryštalizačný skríning.

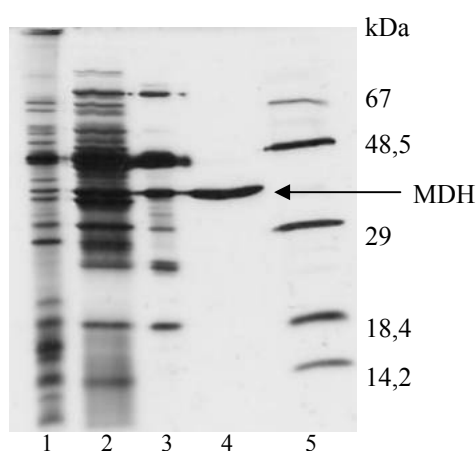
Stanovili sme optimálne podmienky pre kryštalizáciu natívnej MDH zo *S. coelicolor* A3(2). Ihličkovité kryštály narástli vo visiacej kvapke obsahujúcej 0,1 M Na-citrátový tlmivý roztok pH 4,8; 0,2 M octan amónny; 27% (w/v) PEG 4000 a s/bez 100 μ M kyseliny oxaloctovej (obr. 4). Ako vidieť z obr. 5, zvyšovanie pH tlmivého roztoku spôsobuje zmenu tvaru kryštálov (0,1 M Na-



Obr. 2. Kryštály rekombinantnej MDH bez His.Tag sekvencie narastené vo visiacej kvapke; A 0,1 M Na-citrátový tlmivý roztok pH 5,6; 0,2 M octan amónny; 80 μ M kyselina oxaloctová; 27% (w/v) PEG 4000; A₁ dvojdielne kryštály; A₂ osemdielne kryštály; B 0,1 M Na-citrátový tlmivý roztok pH 5,4; 0,2 M octan amónny; 26% (w/v) PEG 4000 s koenzýmom NADH; C 0,1 M Na-citrátový tlmivý roztok pH 6,0; 0,2 M octan amónny; 27% (w/v) PEG 4000 s koenzýmom NADH; D 0,1 M Na-citrátový tlmivý roztok pH 6,0; 0,2 M octan amónny; 26% (w/v) PEG 4000 s koenzýmom NADPH; E 0,1 M Na-citrátový tlmivý roztok pH 5,4; 0,2 M octan amónny; 27% (w/v) PEG 4000 s koenzýmom NADH; F 0,1 M Na-citrátový tlmivý roztok pH 6,0; 0,2 M octan amónny; 23% (w/v) PEG 4000; F₁ pred otvorením kvapky; F₂ po otvorení kvapky

Tabuľka II
Purifikácia MDH z kmeňa *S.coelicolor* A3(2)

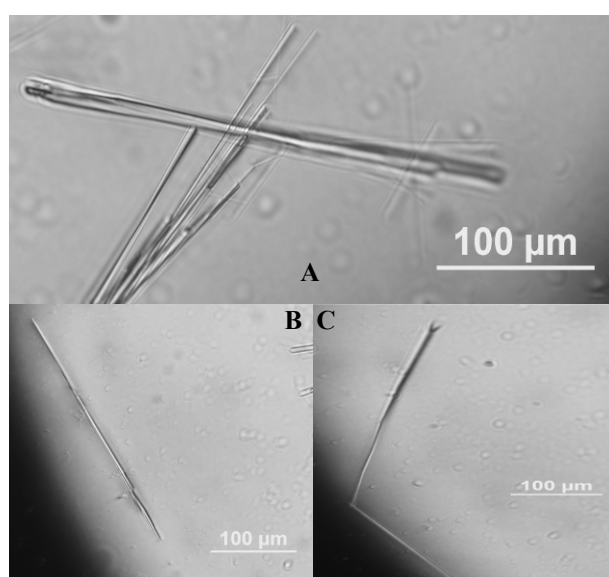
Frakcia	Objem [ml]	Celkové proteíny [mg]	Celková aktivita [U]	Špecifická aktivita [U mg ⁻¹]	Výtťažok [%]	Purifikačný faktor
Homogenát	225	448	10 573	24	100	1
30–80 % (w/v) frakcionácia síranom amónnym	39,5	222	8887,5	40	84	1,6
DEAE celulóza DE-52	63	70	4764	68	45	2,8
Phenyl Sepharóza CL 4B	25	20	4315	216	41	9
Matrex Red A	14	2,5	2529	1012	24	42



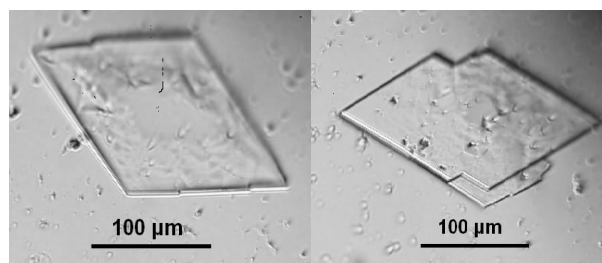
Obr. 3. Purifikácia MDH z kmeňa *S.coelicolor* A3(2). SDS-PAGE (12 % w/v). Dráha č. 1: spojené frakcie po chromatografii na DEAE celulózy, dráha č. 2: spojené frakcie po chromatografii na Phenyl Sepharóze, dráha č. 3: spojené frakcie po chromatografii na kolóne Matrex Red A, dráha č. 4: proteínové štandardy: hovädzi sérum albumín (M_r 67 000), fumaráza (M_r 48 500), anhydrazá kyseliny uhličitej (M_r 29 000), β -laktoglobulín (M_r 18 400) a α -laktalbumín (M_r 14 200)

citrátový tlmivý roztok pH 5,6; 0,2 M octan amónny; 27% PEG 4000 s koenzýmom NADH). Kryštály natívnej MDH izolovanej z kmeňa *S. coelicolor* A3(2) boli stabilné a nedochádzalo k ich rozpúšťaniu a postupnej degradácii v porovnaní s kryštálmi rekombinantnej MDH bez His.Tag sekvencie a budú vhodnejšie pre následné experimenty.

Táto publikácia bola vytvorená realizáciou projektu "BIOMAKRO1 ITMS:26240120003", "BIOMAKRO2 ITMS:26240120027", na základe podpory operačného programu Výskum a vývoj financovaného z Európskeho fondu regionálneho rozvoja a grantu VEGA 1/0371/09."



Obr. 4. Kryštály MDH z kmeňa *S.coelicolor* A3(2) vo visiacej kvapke; A, B 0,1 M Na-citrátový tlmivý roztok pH 4,8, 0,2 M octan amónny, 27% (w/v) PEG 4000; C 0,1 M Na-citrátový tlmivý roztok pH 4,8, 0,2 M octan amónny, 100 μM kyselina oxaloctová, 27% (w/v) PEG 4000



Obr. 5. Kryštály MDH z kmeňa *S.coelicolor* A3(2) vo visiacej kvapke; podmienka: 0,1 M Na-citrátový tlmivý roztok pH 5,6, 0,2 M octan amónny, 27% (w/v) PEG 4000 s koenzýmom NADH

LITERATÚRA

1. Wynne S. A., Nicholls D. J., Scawen M. D., Sundaram T. K.: *Biochem. J.* 317, 235 (1996).
2. Genda T., Nakamatsu T., Ozaki H.: *J. Bioscience and Bioeng.* 95, 562 (2003).
3. Mikulášová D., Kollárová M., Miginiac-Maslow M., Decottignies P., Jacquot J.-P., Kutejová E., Merník N., Együdová I., Musrati R., Horecká T.: *FEMS Microbiol. Lett.* 159, 299 (1998).
4. Tomita T., Fushinobu S., Kuzuyama T., Nishiyama M.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 334, 613 (2005).
5. Honka E., Fabry S., Niermann T., Palm P., Hensel R.: *Eur. J. Biochem.* 188, 623 (1990).
6. Lee B. I., Chang Ch., Cho S.-J., Eom S. H., Kim K. K., Yu Y. G., Suh S. W.: *J. Mol. Biol.* 307, 1351 (2001).
7. Ruelland E., Miginiac-Maslow M.: *Trends Plant Sci.* 4, 136 (1999).
8. Muslin E. H., Li D., Stevens F. J., Donnelly M., Schiffer M., Anderson L. E.: *Biophys. J.* 68, 2218 (1995).
9. Hopwood D. A., Bibb M. J., Chater K. F., Kieser T., Bruton C. J., Kieser H. M., Lydiate D. J., Smith C. P., Ward J. M., Schrepf H.: *Genetic manipulation of Streptomyces – A laboratory manual*. John Innes Institute Norwich, 1985.
10. Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D. O., Seidmann J. S., Smith J. A., Struhl K.: *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley, New York 1987.
11. Laemli U. K.: *Nature* 227, 680 (1970).
12. Blum H., Beier H., Gross H. J.: *Electrophoresis* 8, 93 (1987).
13. Issakidis E., Miginiac-Maslow M., Decottignies P., Jacquot J.-P., Crétin C., Gadal P.: *J. Biol. Chem.* 267, 21577 (1992).

D. Mikulášová, M. Koháryová, P. Štefanková, and M. Kollárová (*Department of Biochemistry, Faculty of Natural Sciences, Comenius University, Bratislava, Slovak Republic*): **Characterization, Properties and Crystallization of Malate Dehydrogenase from *Streptomyces coelicolor***

Malate dehydrogenase (MDH) isolated from *Streptomyces coelicolor*, A3(2) strain, electrophoretically homogenous, was crystallized in the absence or in the presence of NADH or NADPH coenzymes by the hanging-drop vapor-diffusion method. For simple isolation in a sufficient yield, the above MDH was cloned and expressed in *Escherichia coli*. Recombinant MDH with His-tag sequence did not crystallize whereas that without His-tag sequence crystallized using the above method. The crystals were grown in a mixture of 0.1 M sodium citrate buffer (pH 5.6), 0.2 M ammonium acetate, 27% (w/v) poly(ethylene glycol) 4000, and 5 mM NADH coenzyme or in a mixture of 0.1 M sodium citrate buffer (pH 4.8), 0.2 M ammonium acetate, 100 μ M oxaloacetic acid, and 27% (w/v) poly(ethylene glycol) 4000.