

УДК 612.321.5: 599.324.4

ОЧИСТКА И НЕКОТОРЫЕ СВОЙСТВА 6-ФОСФОГЛЮКОНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ИЗ ПЕЧЕНИ КРЫСЫ

© 2005 г. М.М. Свиридов, Т.Н. Попова, А.В. Семенихина

Воронежский государственный университет

С помощью многостадийной очистки, включающей высаливание сульфатом аммония, хроматографию на сефадексе G-25, ионообменную хроматографию на ДЭАЭ-целлюлозе, получен ферментный препарат 6-фосфоглюконатдегидрогеназы с удельной активностью 0,966 ФЕ/мг. Степень очистки и выход фермента составили 25,4 и 3,98% соответственно. Были определены каталитические характеристики 6-фосфоглюконатдегидрогеназы из печени крысы.

ВВЕДЕНИЕ

Изучение свойств, регуляции активности, механизма действия ферментов позволяет приблизиться к детальному анализу организации метаболизма клетки. В этой связи представляет интерес исследование 6-фосфоглюконатдегидрогеназы (6-ФГДГ, КФ 1.1.1.44.), являющейся одним из ключевых ферментов пентозофосфатного пути (ПФП). Наряду с глюкозо-6-фосфатдегидрогеназой, 6-ФГДГ участвует в генерации НАДФН, изменяя тем самым соотношение восстановленных и окисленных эквивалентов в клетке. Восстановительные эквиваленты расходуются в биосинтетических процессах, в частности для биосинтеза жирных кислот, стероидов и восстановления глутатиона, который необходим для поддержания конформации клеточных белков. Также предполагается, что образовавшийся в ПФП НАДФН может использоваться глутатионредуктазной/глутатионпероксидазной антиоксидантной системой, осуществляющей детоксикацию пероксида водорода с помощью восстановленного глутатиона под действием глутатионпероксидазы [1].

В этой связи целью настоящей работы было получение очищенного препарата 6-ФГДГ из печени крыс и исследование каталитических свойств фермента.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве объекта исследования использовали самцов белых лабораторных крыс (*Rattus rattus* L.), массой 200-250 г., содержащихся на стандартном рационе вивария. Печень у животных извлекали после многократного перфузирования физиологическим раствором.

Активность фермента определяли спектрофотометрически на СФ-56 при 340 нм в среде содержащий: 50 ммоль/л трис-НСI буфера (рН 7,8), 1 ммоль/л

6-фосфоглюконата и 0,12 ммоль/л НАДФ. О скорости протекания реакции судили по увеличению оптической плотности опытных образцов в результате восстановления НАДФ в ходе катализируемого превращения 6-фосфоглюконата в рибулозо-5-фосфат. За единицу активности принимали количество фермента, катализирующее образование 1 мкмоль продукта за 1 мин при 25°C. Активность фермента выражали в ФЕ на мг белка. Содержание белка определяли по методу Лоури [2].

Очистка 6-ФГДГ из гепатоцитов крыс включала несколько этапов.

Навеску ткани печени гомогенизировали в 3-х кратном объеме среды выделения следующего состава: 50 ммоль/л трис-НСI буфер (рН 7,8), содержащий 1 ммоль/л ЭДТА, 0,01% β-меркаптоэтанол. Гомогенат фильтровали и центрифугировали при 5000 g в течение 10 мин. Осадок, содержащий в основном клеточные стенки, отбрасывали. Полученный супернатант фракционировали с помощью сульфата аммония, выделяя фракцию в пределах насыщения $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 40-75%. Полученный осадок ресуспендировали в среде выделения. Освобождение белковой смеси от низкомолекулярных примесей осуществляли с помощью гель-фильтрации через колонку с сефадексом G-25 (1,8×20 см). В качестве элюирующей среды использовали 10 ммоль/л трис-НСI буфер (рН 7,8) содержащий 0,5 ммоль/л ЭДТА и 0,01% β-меркаптоэтанол. Каждую полученную фракцию, объемом 3 мл, анализировали на присутствие ферментативной активности. Фракции, обладающие максимальной ферментативной активностью, объединяли и использовали для дальнейшей очистки.

Обессоленный раствор фермента наносили на колонку с ДЭАЭ-целлюлозой (1,2×15 см), уравновешенную буфером, используемым на предварительной стадии очистки. Для очистки 6-ФГДГ исполь-

зовали линейный градиент концентраций КС1 (0-200ммоль/л) в элюирующем буфере. Частично очищенный ферментный препарат использовали для исследования каталитических свойств фермента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На этапе высаливания наблюдалось снижение удельной ферментативной активности фермента в 1,3 раза по сравнению со значениями в гомогенате печени. Это может быть связано с ингибирующим действием сульфата аммония. Активность 6-ФГДГ восстанавливалась после отделения низкомолекулярных примесей с помощью сефадекса G-25. Значение удельной ферментативной активности возросло в 2,3 раза по сравнению с начальной в гомогенате печени.

Элюцию 6-ФГДГ с ДЭАЭ-целлюлозы проводили с помощью линейного градиента КС1 0-200 ммоль/л (общий объем 100 мл). Десорбция фермента происходила при концентрации КС1 равной ~100 ммоль/л.

Таким образом, был получен ферментный препарат более чем с 25 – кратной степенью очистки и удельной активностью 0,966 ФЕ/мг белка. Выход

составил 3,98%. Результаты очистки представлены в таблице 1.

По литературным данным 6-ФГДГ, выделенная из печени крыс, является гомодимером, состоящим из двух субъединиц каждая с молекулярным весом – 54 кДа [3], или гомотетрамером с молекулярным весом 240 кДа состоящим из одинаковых субъединиц с молекулярным весом в 61 кДа [4]. Исходя из полученных нами экспериментальных данных молекулярный вес фермента, определенный методом гель-фильтрации через сефадекс G-150, равен 109,35±3,45 кДа.

Зависимости ферментативной активности 6-ФГДГ от концентрации НАДФ и 6-фосфоглюконата представлены на рис. 1 и 2. Для 6-ФГДГ была установлена гиперболическая зависимость начальной скорости реакции как от концентрации субстрата, так и от концентрации НАДФ. Графическое представление полученных данных в координатах Лайнуивера-Берка позволило определить кинетические характеристики фермента. Значения K_m и V_{max} для субстрата составили 0,13 ммоль/л и 0,62 мкл/мин, для НАДФ – 0,027 ммоль/л и 0,072 мкл/мин соответственно.

Таблица 1

Очистка 6-фосфоглюконатдегидрогеназы из печени крыс

Стадия очистки	Активность, ФЕ	Количество белка, мг	Удельная активность ФЕ/мг белка	Выход, %	Степень очистки
гомогенат	7,04±0,77	183,51±16,84	0,038±0,01	100	1
Высаливание (NH ₄) ₂ SO ₄	0,92±0,37	30,01±0,12	0,031±0,01	13,07±3,85	0,82 ±0,16
хроматография на G-25	2,48±0,39	28,51±4,02	0,087±0,03	35,23±1,76	2,29 ±0,23
хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе	0,28±0,09	0,29±0,01	0,966±0,27	3,98±0,82	25,42 ±2,07

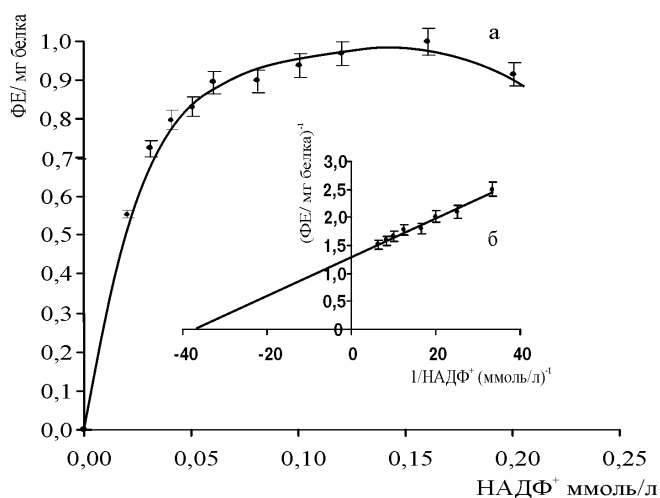


Рис. 1. Зависимость активности 6-фосфоглюконат дегидрогеназы от концентрации НАДФ

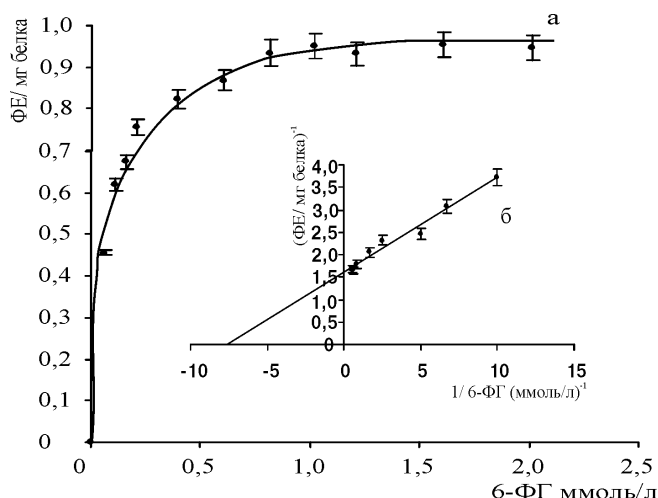


Рис. 2. Зависимость активности 6-фосфоглюконат дегидрогеназы от концентрации 6-фосфоглюконата

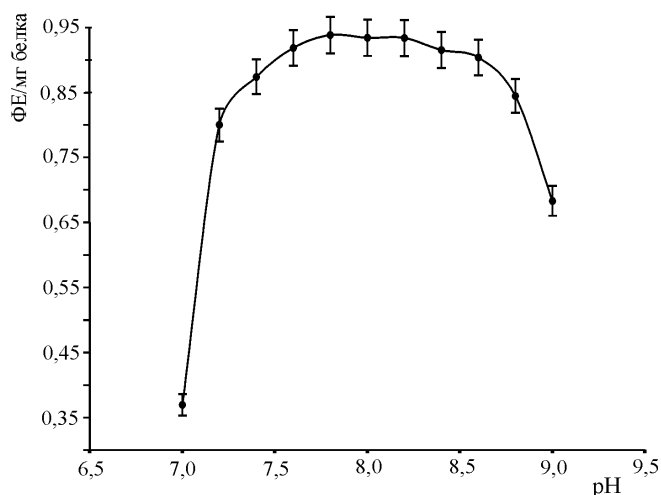


Рис. 3. Зависимость активности 6-фосфоглюконат дегидрогеназы от значения рН

6-ФГДГ проявляет максимальную ферментативную активность в диапазоне рН 7,6-8,6 аналогично ферменту, полученному из других источников [5, 6, 7, 8]. Уменьшение рН до 7,0 или увеличение его до 9,0 приводит к резкому снижению активности фермента (рис.3).

В ходе экспериментальной работы были исследованы зависимости активности 6-ФГДГ от концентрации ионов Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} в диапазоне 0-12ммоль/л. Ионы Mg^{2+} в концентрациях 2-6 ммоль/ли ионы Ca^{2+} в концентрациях 2-4ммоль/л статистически достоверно не влияли на активность фермента. Дальнейшее увеличение концентрации данных ионов металлов приводило к уменьшению активности фермента (рис. 4).

Влияние ионов Mn^{2+} на активность 6-ФГДГ представлено на рисунке 3. Как видно из представленных данных, ионы Mn^{2+} оказывают ингибирующее действие на фермент во всем исследованном диапазоне.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Федорова Н.Ю. Состояние системы глутатионпероксидазы-глутатионредуктазы в стимулированном к регенерации органе и ее роль в клеточной пролиферации: Дисс. канд. биол. наук / Н.Ю. Федорова. – Воронеж, 1999. – С.44-45.
2. Lowry O. Protein measurement with the Folin-Phenol reagent / O. Lowry, N. Rosebrough, A. Farr // J. Biol. Chem. – 1951. – V. 194, №1. – P.265-271.

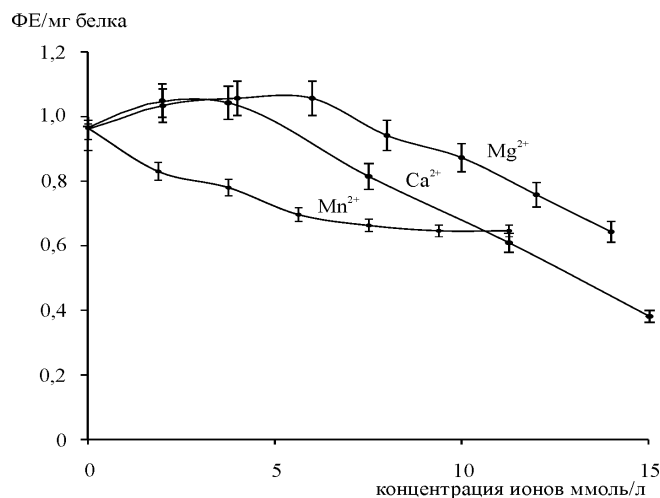


Рис. 4. Зависимость активности 6-фосфоглюконат дегидрогеназы от концентрации ионов металлов

3. Маглыш С.С. Очистка и некоторые свойства молекулярных форм 6- фосфоглюконатдегидрогеназы из печени крыс / С.С. Маглыш, З.В. Горбач, Ю.М. Островский // Биохимия. – 1982. – Т 5. вып. 5. – С. 2035 – 2041.

4. Gordillo E. Implication of lysine residues in the loss of enzymatic activity in rat liver 6-phosphogluconate dehydrogenase found in aging / E. Gordillo, A Ayala, J. Bautista et al. // J. Biol. Chem. – 1989. – V. 264. – №29. – P. 17024-17028.

5. Barash V. Microsomal hexose-6-phosphate and 6-PGDG in extrahepatic tissues: human placenta and pig kidney cortex. / V. Barash, T. Erlich, N. Bashan // Biochem. Int. – 1990. – V.20, №2. – P.267 – 274.

6. Heejeong Y. Kinetic studie of Haemophilis influenzae 6-PGDG / Y. Heejeong, Anderson C. B., Anderson B. M. // Biochem. Et biophys. Acta. P. – 1989-1994, №1. – P.75-80.

7. Garcia Martin L. O. Purification and properties of 6-PGDG from Mytilus galloprovincinalis digestive gland / L. O.Garcia Martin, M. Abad, J. L. Sanches // Comp. Biochem. and physiol. – 1984. – V. 79, №4. – P. 599-606.

8. Hanan S. 6-PGDG from Lactococcus Lactis: A role for arginine residues in binding substrate and coenzyme. / S. Hanan, M.G Adams // Boichem. J. – 1999. – V.338, №1. – P.55 – 60.