

РЕГУЛЯТОРНЫЕ И КИНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ АКОНИТАТГИДРАТАЗЫ ИЗ РАСТИТЕЛЬНЫХ И ЖИВОТНЫХ ТКАНЕЙ

М. В. Зайчикова, А. Альнассер, А. О. Королькова, А. Т. Епринцев

Воронежский государственный университет

Поступила в редакцию 09.07.2010 г.

Аннотация. Получение в гомогенном состоянии ферментных препаратов позволило изучить регуляторные и кинетические характеристики данной формы аконитазы. На основании полученных данных возможно сделать предположение о механизмах регуляции цитоплазматической аконитатгидратазы из растительных и животных тканей.

Ключевые слова: аконитатгидратаза, аконитаза, изоформы, очистка, щитки кукурузы, гепатоциты, регуляторные и кинетические свойства.

Abstract. Purification of enzyme in the homogeneous state allowed to study the regulatory and kinetic characteristics of this form of aconitase. According to this data, it is possible to make an assumption about the mechanisms of regulation of cytoplasmic aconitate hydratase from plant and animal tissues.

Keywords: aconitate hydratase, aconitase, isoforms, purification, maize scutellum, hepatocytes, regulatory and kinetic properties.

ВВЕДЕНИЕ

Одним из наиболее перспективных направлений современной биохимии является выяснение механизмов регуляции онтогенеза живых организмов, а также метаболических путей, обеспечивающих контроль биосинтетических процессов в клетке.

Аконитатгидратаза (аконитаза, АГ, КФ 4.2.1.3) представляет значительный интерес для изучения физико-химических и кинетических свойств, являясь ферментом, выполняющим в клетке ряд важнейших функций. Как известно, главная роль АГ — обеспечение функционирования цикла трикарбоновых кислот. Кроме того, важное значение имеет фермент в условиях изменения факторов внутренней и внешней среды и при необходимости протекания глюконеогенеза на различных этапах онтогенеза [1, 2].

Существуют данные, свидетельствующие об индукции аконитатгидратазной активности в различных организмах. Обнаружено увеличение активности данной ферментной системы в гепатоцитах крыс с индуцированным аллоксановым диабетом [3, 4], и при прорастании семян масличных растений в момент интенсификации глюконеогенетических процессов [5]. Остаются неизвестными механизмы изменения аконитазной активности в

тканях организмов, относящихся к разным таксономическим группам.

В связи с этой целью работы было получено в гомогенном состоянии цитоплазматической аконитатгидратазы из щитков кукурузы и печени крыс с аллоксановым диабетом, а также исследование регуляторных и кинетических свойств фермента.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве объектов исследования использовали щитки кукурузы (*Zea mays* L.), выращенные гидропонным способом при 25 °С, а также самцы беспородных лабораторных крыс (*Rattus rattus* L.) массой 200—300 г. Животных выращивали при обычных условиях питания, а затем инъектировали подкожно 5 % аллоксаном (100 мг/кг веса, раствор в 0,9 % NaCl) [6].

Индукцию диабета контролировали по изменению концентрации глюкозы в крови животных. Кровь брали из хвостовой вены крысы. Определение глюкозы производили с помощью глюкометра «Сателлит плюс».

Активность ферментов определяли спектрофотометрически на СФ-2000 при длине волны равной 240 нм [7]. Содержание белка измеряли по методу Лоури [8]. Электрофоретические исследования осуществляли по методу Дэвиса [7] в 7,5 % ПААГ. Универсальное окрашивание белков осуществляли кумасси [8], специфическое проявление — с помощью тетразолиевого метода [7].

© Зайчикова М. В., Альнассер А., Королькова А. О., Епринцев А. Т., 2010

Разделение цитоплазматической и митохондриальной форм аконитатгидратазы осуществляли с помощью дифференциального центрифугирования [9].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Применение 4-х стадийной схемы очистки, результаты которой представлены в таблице 1, позволило получить цитоплазматическую АГ из щитков кукурузы в гомогенном состоянии. При этом удельная активность фермента составила 2,6 Е/мг белка, степень очистки — 52 раза, выход — 17 %.

Для получения гомогенного препарата аконитазы из печени крыс с индуцированным аллоксановым диабетом была проведена 5-и стадийная очистка (табл. 2). Для АГ удельная активность со-

ставила 2,06 Е/мг белка, степень очистки 76 раз, выход 3 %.

Проведенный электрофоретический анализ очищенных препаратов аконитазы показал, что в полиакриламидном геле, окрашенном кумасси, проявилось по одной белковой полосе в каждой пробе, что свидетельствует о гомогенности полученных форм фермента. Относительная электрофоретическая подвижность АГ из щитков кукурузы составила 0,58, а из печени крыс 0,56.

Получение препаратов АГ в гомогенном состоянии позволило исследовать регуляторные и кинетические свойства фермента из животных и растительных объектов.

В ходе многочисленных экспериментов исследовано сродство фермента к различным субстратам, а именно к цитрату и изоцитрату. Показано,

Таблица 1

Схема очистки цитоплазматической аконитатгидратазы из щитков кукурузы ($n = 3, P < 0,05$)

Стадия очистки	Объем, мл	Общая активность, Е	Общий белок, мг	Удельная активность, Е/мг белка	Выход, %	Степень очистки
Гомогенат	17	11	220	0,05	100	1
Фракционирование сульфатом аммония	2,5	7,8	25	0,31	71	6,2
Гель-фильтрация на G-25	3	7,4	22	0,34	67	6,8
Ионообменная хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе	2	1,85	0,71	2,6	17	52

Таблица 2

Схема очистки цитоплазматической формы аконитазы из печени крыс с аллоксановым диабетом ($n = 3, P < 0,05$)

Стадия	Объем, мл	Активность, Е	Общий белок, мг	Удельная активность, Е/мг белка	Выход, %	Степень очистки
Гомогенат	8	10,5	384,8	0,0272	100	1
Фракционирование сульфатом аммония	1,5	7,6	68,82	0,110	72,4	4
Гель-фильтрация на G-25	1,5	3,5	26,6	0,131	33,3	5
Хроматография на ДЭАЭ-сефарозе	2	0,8	0,7	1,14	7,6	42
Гель-фильтрация на Toyopearl HW-65	2	0,3	0,145	2,06	3	76

Таблица 3
Регуляторные и кинетические характеристики
цитоплазматической аконитазы
из исследуемых объектов

Свойства	АГ из щитков кукурузы	АГ из печени крыс с аллоксановым диабетом
K_m по изоцитрату (мМ)	1,8	0,21
K_m по цитрату (мМ)	9,6	0,65
pH оптимум	8,0	7,5

что кинетика реакций подчиняется уравнению Михаэлиса — Ментен. Методом Лайнуивера — Берка определены значения K_m (табл. 3). Для аконитазы из щитков кукурузы K_m по цитрату составила 9,6 мМ, по изоцитрату 1,8 мМ, а для АГ из гепатоцитов крыс 0,65 и 0,21 мМ соответственно.

Изучено влияние концентрации ионов водорода на активность цитоплазматической аконитатгидратазы из животных и растительных объектов. Для аконитазы из щитков кукурузы оптимальное значение pH составило 8,0; а для АГ из печени крыс с аллоксановым диабетом 7,5.

В данной работе было выявлено ингибирующее влияние пероксида водорода на активность цитоплазматической формы аконитатгидратазы из исследуемых объектов.

Показано, что при инкубации АГ из щитков кукурузы в течение 5 минут с 50, 100 и 500 мк

перекиси, активность фермента снижалась в 2, 6,5 и 7 раз соответственно (рис. 1).

Изучение влияния перекиси водорода на активность исследуемой формы аконитатгидратазы, выделенной из гепатоцитов крыс в условиях аллоксанового диабета и нормальных условиях, показало ингибирование ферментативной активности перекисью водорода. Концентрация H_2O_2 — 1 мМ/мл и 1,2 мМ/мл полностью инактивирует цитоплазматическую аконитазу при диабете и в норме соответственно (рис. 2).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

То, в результате данной работы получены гомогенные препараты цитоплазматической аконитатгидратазы из щитков кукурузы и из гепатоцитов крыс, а также исследованы регуляторные и кинетические характеристики фермента.

Исследование K_m показало, что аконитаза из растительных и животных объектов имеет большее сродство к изоцитрату, чем к цитрату. Оптимальное для работы фермента значение pH различалось незначительно.

Инактивирующее действие пероксида водорода может быть обусловлено окислением железосерного кластера АГ, который входит в активный центр фермента.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Епринцев А. Т., Попов В. Н., Шевченко М. Ю. Глиоксилатный цикл: универсальный механизм адаптации? М.: ИКЦ «Академкнига», 2007. — 228 с.
2. Епринцев А. Т., Попов В. Н. Ферментативная регуляция метаболизма ди- и трикарбонных кислот в растениях. Воронеж: ВГУ, 1999. — 192с.

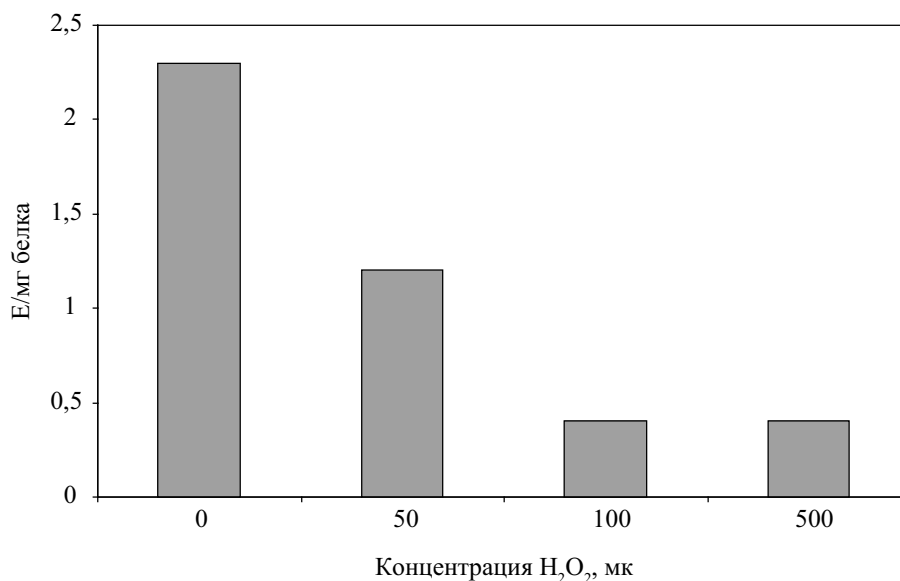


Рис. 1. Влияние пероксида водорода на активность аконитазы из щитков кукурузы ($n=3$, $P<0,05$)

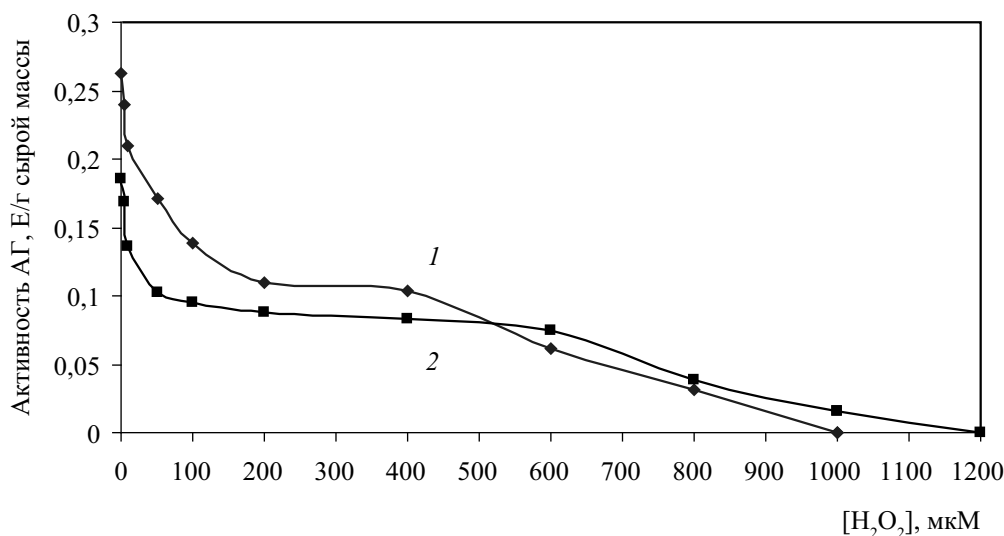


Рис. 2. Влияние перекиси водорода на активность аконитазы из гепатоцитов крыс. Обозначения: 1 — опыт (цитоплазматическая форма АГ в условиях диабета); 2 — контроль (цитоплазматическая форма АГ в нормальных условиях)

3. Popov V. N., Igamberdiev A. U., Schnarrenberger C. Induction of glyoxylate cycle enzymes in rat liver upon food starvation // FEBS Lett. — 1996. — Vol. 390. — P. 258—260.

4. Волвенкин С. В., Попов В. Н., Епринцев А. Т. Субклеточная локализация и свойства ферментов глиоксилатного цикла в печени крыс с аллоксановым диабетом // Биохимия. — 1999. — Т.64, №. 9. — С. 1185—1191.

5. Епринцев А. Т., Землянухин Л. А., Алексюк М. П. Очистка и некоторые свойства аконитатгидратазы из щитка кукурузы // Биохимия. — 1995. Т.60. — №8, С. 1244—1250.

6. Епринцев А. Т., Семенова Е. В., Попов В. Н. Индукция аконитатгидратазы в гепатоцитах голодающих крыс // Биохимия. — 2002. — Т.67, №7. — С. 956—966.

7. Епринцев А. Т., Климова М. А. Очистка ферментов и методы исследования их каталитических свойств — Воронеж: Изд-во Воронеж. гос. ун-та, 2008. — 36 с.

8. Землянухин А. А., Землянухин Л. А. Большой практикум по физиологии и биохимии растений // ВГУ. — Воронеж, 1996. — С.38—39, 67—68, 87—89.

9. Courtois-Verniquet F, Douce R. Lack of aconitase in glyoxysomes and peroxisomes // Biochem. J. — 1993. — № 294. — P. 103—107.

Зайчикова Марина Викторовна — аспирант, кафедра биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет; e-mail: marinazajchikova@yandex.ru

Альнассер Амин — аспирант, кафедра биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет

Королькова Анастасия Олеговна — студент, кафедра биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет

Епринцев Александр Трофимович — д.б.н., кафедра биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет

Zajchikova Marina V. — graduate student, Department of Biochemistry and Cell Physiology, Voronezh State University

Alnasser Amin — graduate student, Department of Biochemistry and Cell Physiology, Voronezh State University

Korolkova Anastasiya O. — student, Department of Biochemistry and Cell Physiology, Voronezh State University

Eprintsev Alexander T. — Doctor of Biology, Department of Biochemistry and Cell Physiology, Voronezh State University