

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ТЕТРАМЕРОВ И СУБЪЕДИНИЦ ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В ИНТАКТНОМ СОСТОЯНИИ И В УСЛОВИЯХ ФОТОСЕНСИБИЛИЗИРОВАННОГО ОКИСЛЕНИЯ

М. А. Наквасина, В. Г. Артюхов, Н. В. Агишева

Воронежский государственный университет

Поступила в редакцию 12.12.2011 г.

Аннотация. Получены активные иммобилизованные на сефарозе 4В тетрамеры и субъединицы лактатдегидрогеназы (изофермент A_4); исследованы их каталитические свойства в интактном состоянии и в условиях фотосенсибилизированного метиленовым голубым окисления ее молекул. Выявлено, что межсубъединичные контакты не являются необходимыми для формирования активного центра фермента, а служат для регуляции активности отдельных мономеров в составе олигомерной молекулы. Получены доказательства участия синглетного молекулярного кислорода в процессах фотоинактивации иммобилизованных тетрамеров и субъединиц лактатдегидрогеназы.

Ключевые слова: лактатдегидрогеназа, тетрамеры, субъединицы, иммобилизация, активность, синглетный кислород, фотосенсибилизированное окисление.

Abstract. Active, immobilized on sepharose 4B, tetramers and subunits of lactatedehydrogenase (isoenzyme A_4) are gained; their catalytic properties in an intact state and in requirements of the photosensibilization by methylene blue oxidizing of its molecules are explored. It is taped, that intersubunit contacts are not necessary for formation of the enzyme active centre, and serve for regulation of separate monomers activity in structure of oligomeric molecules. Proofs for participation of singlet molecular oxygen in processes of lactatedehydrogenases tetramers and subunits photoinactivation are gained.

Keywords: lactatedehydrogenase, tetramers, subunits, immobilization, activity, singlet oxygen, photosensibilization oxidizing.

Одной из актуальных проблем молекулярной биофизики является выяснение функциональной роли четвертичной структуры важнейших олигомерных белков клеточного метаболизма. К числу ключевых ферментов, участвующих в тонкой регуляции метаболических процессов, относится лактатдегидрогеназа (ЛДГ), которая работает на «развилке» путей аэробного и анаэробного превращения углеводов в тканях. Традиционно считается, что в ходе каталитической реакции субъединицы не взаимодействуют между собой, поэтому кинетические свойства, например, изоформы B_3A и смеси изоформ B_4 и A_4 в соотношении 3:1 идентичны. В то же время ряд исследователей [1—3] указывает на то, что через межсубъединичные контакты стабилизируется структура глобул и передаются конформационные изменения, которые могут иметь важное значение не только для согласованной работы всех активных центров молекулы, но и являться механизмом регуляции активности фермента на уровне клетки.

Одним из подходов для выяснения механизма белок-белковых взаимодействий и их роли в функционировании ферментов является сравнительное исследование каталитических и физико-химических свойств свободных и иммобилизованных ферментов в олигомерной форме и в виде отдельных субъединиц. Иммобилизация нативных субъединиц биополимеров открыла возможность приготовления препаратов олигомеров-гибридов, которые благодаря связыванию с носителем оказываются значительно более стабильными, чем гибриды в растворе. Иммобилизация на носителе позволяет выявить существование полиферментных ассоциатов, не обнаруживаемых в растворимом состоянии.

В связи с вышеизложенным мы исследовали функциональные свойства иммобилизованных тетрамеров и субъединиц лактатдегидрогеназы в нативном состоянии и в условиях экзогенной генерации синглетного молекулярного кислорода.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

В качестве объекта исследования использовали коммерческий препарат лактатдегидрогеназы из

скелетных мышц свиньи (суспензия в 2,2 моль/л сульфате аммония, "Reanal", Венгрия). Обессоливание препарата ЛДГ осуществляли методом гелепроникающей хроматографии на колонке (150×15 мм), упакованной сефадексом G-25 (fine; "Pharmacia", Швеция). Элюцию фермента проводили 0,1 моль/л Na-фосфатным буфером при температуре +4 °С.

Активацию гранул сефарозы 4В проводили, как описано в работе Т. О. Golovina et al. [4]. Активированные гранулы сефарозы немедленно промывали водой до достижения нейтрального значения pH, а затем 0,1 моль/л Na-фосфатным буфером, содержащим 0,004 моль/л 2-меркаптоэтанола и 0,005 моль/л ЭДТА (pH 8,0—8,5 при 20 °С). Гель добавляли к раствору лактатдегидрогеназы (0,8—0,9 мг/мл) в соотношении 1 г уплотненного геля на 1 мл ферментного раствора. Связывание белка осуществлялось в течение 4 часов при температуре 25 °С и непрерывном осторожном перемешивании. Полученные активные иммобилизованные тетрамеры ЛДГ суспендировали в 0,1 моль/л Na-фосфатном буфере (0,001 моль/л ЭДТА, 0,005 моль/л дитиотреитола; pH 7,4 при 20 °С) и хранили при +4 °С.

Для получения активных иммобилизованных субъединиц тетрамерные молекулы лактатдегидрогеназы, связанные с CNBr-активированной сефарозой 4В через одну субъединицу, подвергали диссоциации до отдельных мономеров [5].

Ферментативную активность ЛДГ определяли спектрофотометрическим методом при длине волны 340 нм.

Концентрацию растворов фермента определяли на спектрофотометре СФ-46 («ЛОМО», Россия) при длине волны 280 нм с использованием коэффициента молярной экстинкции $1,96 \cdot 10^5$ л(моль·см)⁻¹ для мышечной изоформы. Определение содержания белка, иммобилизованного на сефарозе 4В, проводили с использованием реактива Бредфорда.

Фотосенсибилизированное окисление ЛДГ осуществляли в цилиндрическом стеклянном сосуде диаметром 20 мм при постоянном перемешивании. Объем образца — 2 мл. Источником света служило устройство для локального облучения красным светом «УЛОКС», изготовленное по лазерной технологии на основе трехкомпонентного твердого раствора галлия, мышьяка и алюминия (Воронежский филиал государственной научно-производственной фирмы «Микротек»). Длина волны максимума излучения 665 ± 15 нм; диапазон излучения — 630—700 нм; выходная интенсивность излучения — 20 мВт/см². Источник распола-

гался на расстоянии 3 см от образца. В качестве сенсibiliзирующего агента применяли раствор тиазинового красителя метиленового голубого (МГ).

Статистическую обработку результатов экспериментов проводили с помощью пакета прикладных статистических программ "Statgraphics". Достоверность отличий контрольных и экспериментальных результатов оценивали при помощи t-критерия Стьюдента.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

К числу наиболее часто применяемых нерастворимых подложек для ковалентного присоединения белков относится агароза: линейный полисахарид, построенный из чередующихся остатков D-галактозы и звеньев 3,6-ангидро- α -галактозы (гель агарозы со сферическими частицами выпускается фирмой "Pharmacia" (Швеция) под названием сефароза). По своим физическим и химическим характеристикам агароза удовлетворяет почти всем требованиям идеального носителя. Гидроксильные группы полисахарида дают возможность вводить в них различные функциональные остатки, удобные для последующего ковалентного связывания ферментов. В качестве активирующего агента широко используется бромциан (CNBr). Механизм его действия установлен [6]: тремя основными продуктами активации являются эфиры карбаминовой кислоты, имидокарбонаты и эфиры цианатов. Анализ свежеективированной сефарозы показал, что 80 % общей связывающей способности геля обусловлено эфирами цианатов и 20 % — имидокарбонатами.

При иммобилизации на сефарозе, активированной бромцианом, разная прочность пришивки олигомера к носителю может быть достигнута путем изменения степени активации последнего: при увеличении количества добавленного к сефарозе CNBr в 50 раз содержание иммобилизованного белка возрастает в 7,5 раз. Параллельно наблюдается увеличение числа связей между носителем и ферментом таким образом, что в ковалентное присоединение к матрице оказываются вовлеченными несколько субъединиц.

Изменяя характер пришивки олигомера к носителю, можно найти условия, при которых ковалентно связанной с матрицей окажется лишь одна из субъединиц.

На сефарозе такой результат можно получить, если использовать низкие концентрации бромциана (менее 5 мг на 1 мл геля).

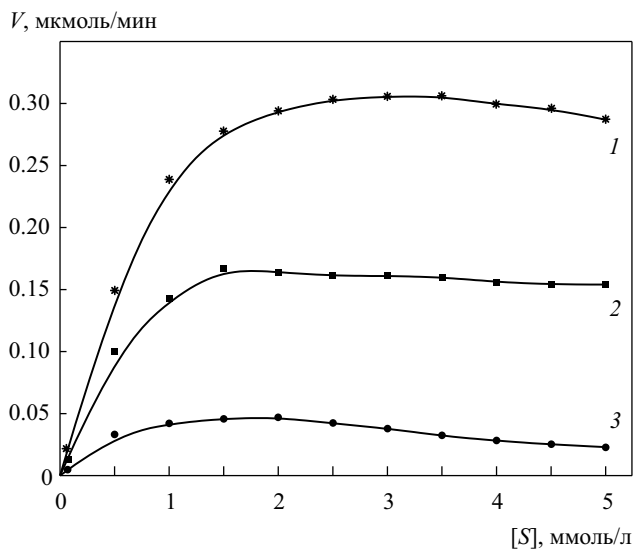


Рис. 1. Зависимость скорости реакции, катализируемой лактатдегидрогеназой из скелетных мышц свиньи (изофермент М4), от концентрации субстрата (пируват): 1 — свободный фермент; 2 — тетрамеры ЛДГ, иммобилизованные на сефарозе 4В через одну субъединицу; 3 — субъединицы ЛДГ, иммобилизованные на сефарозе 4В

Нами были проведены эксперименты по иммобилизации лактатдегидрогеназы из скелетных мышц свиньи (изоформа А₄) на активированной бромцианом сефарозе. Полученные препараты иммобилизованного тетрамера обладали следующими характеристиками: 1) степень активации 5 мг BrCN/мл геля; 2) количество связанного белка ЛДГ 60±4 мкг/мл геля; 3) удельная активность ЛДГ до иммобилизации 300±10 Е/мг белка; 4) удельная активность иммобилизованной ЛДГ 167±4 Е/мг белка.

Обработка иммобилизованной ЛДГ 8 моль/л мочевиной с последующим определением количества остающегося на матрице белка позволяет выяснить, сколько субъединиц тетрамерной молекулы лактатдегидрогеназы присоединено за счет образования ковалентных связей, а сколько субъединиц может отщепиться после разрушения белок-белковых взаимодействий.

Для этого сефарозу с иммобилизованным ферментом промывали 3 объемами раствора 8 моль/л мочевины, затем готовили суспензию из расчета 1 мл геля на 1 мл 8 моль/л мочевины и инкубировали в течение 24 ч при комнатной температуре и постоянном перемешивании. Сефарозу снова промывали 5-кратным объемом 8 моль/л мочевины и отмывали 0,1 моль/л Na-фосфатным буфером (рН 7,4 при 20 °С) до исчезновения поглощения при

280 и 260 нм в промывных водах. Количество связанного белка ЛДГ после такой обработки составило 17±4 мкг/мл геля (т. е. ~25 % от исходной величины), что свидетельствует о ковалентном связывании только одной из четырех субъединиц ЛДГ.

Важными параметрами, характеризующими ферментные препараты, являются кинетические константы. На рис. 1 приведены кривые «насыщения» субстратом (пируватом натрия) свободной лактатдегидрогеназы, иммобилизованных тетрамеров и субъединиц. Кривые имеют гиперболическую форму. Незначительное ингибирование субстратом отмечается для фермента в растворе при концентрации пирувата 4,0—4,5 ммоль/л, для иммобилизованных тетрамеров и субъединиц — 2,0 и 2,5 ммоль/л соответственно. Обработку полученных данных проводили методом Иди-Хофсти в координатах [V; V/S] /254/ (табл.1).

Таким образом, иммобилизация приводит к снижению величин константы Михаэлиса и максимальной скорости ферментативной реакции, катализируемой лактатдегидрогеназой из скелетных мышц свиньи. Отклонения в кинетике могут быть связаны как с непосредственным воздействием иммобилизации на молекулу белка, его конформацию и стабильность, так и с изменением микроокружения фермента, воздействием матрицы на различные этапы каталитического процесса.

Иммобилизация на нерастворимом носителе сопровождается изменением стабильности фер-

Таблица 1
Величины кинетических констант для молекул иммобилизованной и свободной ЛДГ

Исследуемые образцы	K_m , ммоль/л	V_{max} , отн. ед.
Свободный фермент	1,18±0,02	0,50±0,10
Иммобилизованные тетрамеры	0,75±0,01 (набл.)*	0,27±0,12 (набл.)*
Иммобилизованные мономеры	0,35±0,04 (набл.)*	0,08±0,01 (набл.)*

Примечание: * — кинетические константы, измеренные для иммобилизованных препаратов экспериментально, не соответствуют истинным кинетическим параметрам, определяемым для гомогенных ферментативных реакций, поэтому в соответствии с рекомендациями Международной Комиссии по ферментной технологии эти величины указываются с пометкой «набл.» — наблюдаемые.

ментного препарата и, в частности, его устойчивости по отношению к денатурирующим воздействиям различной природы.

Нами выявлено [7], что синглетный кислород играет существенную роль в процессе УФ-инактивации свободной лактатдегидрогеназы. В связи с этим представлялось необходимым провести исследование возможности взаимодействия этой активной формы кислорода с иммобилизованными тетрамерами и субъединицами ЛДГ.

На рис. 2 представлена зависимость каталитической активности лактатдегидрогеназы (изоформа

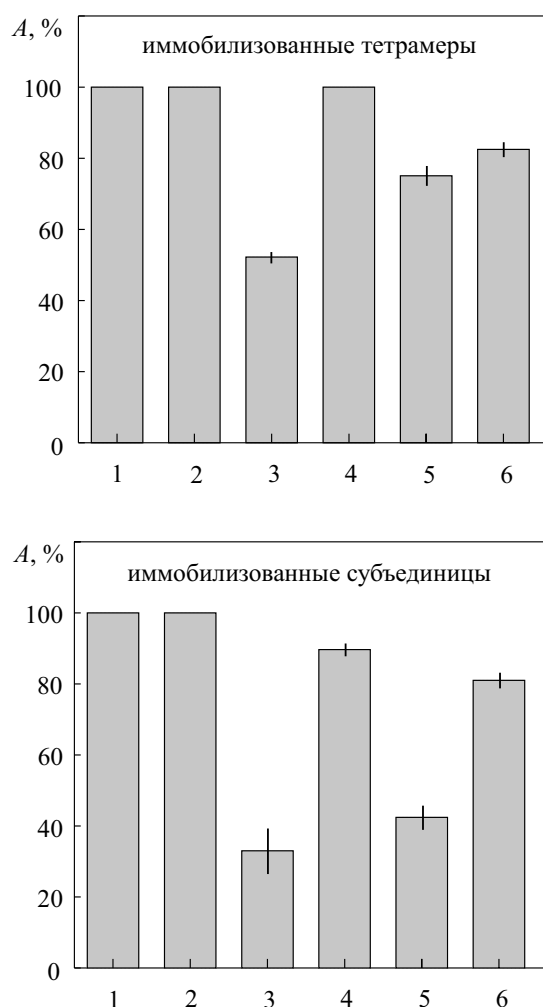


Рис. 2. Уровень каталитической активности ЛДГ, иммобилизованной на сефарозе 4В после облучения красным светом в присутствии метиленового голубого: 1 — нативный фермент; облучение красным светом в течение 15 мин иммобилизованного ферментного препарата: 2 — без метиленового голубого (МГ); 3 — в присутствии МГ в концентрации 10^{-5} моль/л; 4 — в присутствии МГ в концентрации 10^{-5} моль/л и азид натрия (10^{-3} моль/л); 5 — в присутствии МГ в концентрации 10^{-6} моль/л; 6 — в присутствии МГ в концентрации 10^{-6} моль/л и азид натрия (10^{-3} моль/л)

А₄), иммобилизованной на сефарозе 4В, после облучения красным светом в присутствии метиленового голубого (т. е. в условиях экзогенной генерации $^1\text{O}_2$). Из анализа данных следует, что введение в систему МГ в концентрации 10^{-5} моль/л индуцировало снижение функциональной активности ЛДГ на 48 и 67 % для иммобилизованных тетрамеров и субъединиц соответственно. Для МГ в концентрации 10^{-6} моль/л величины инактивации составляли 25 % (иммобилизованные тетрамеры) и 58 % (иммобилизованные субъединицы).

Использование эффективного тушителя синглетного кислорода — азид натрия (концентрация 10^{-3} моль/л) — сопровождалось статистически достоверным восстановлением активности иммобилизованных препаратов ЛДГ по отношению к этому показателю при облучении свободного белка. Причем в случае с иммобилизованными тетрамерами (концентрация МГ — 10^{-5} моль/л) активность в присутствии NaN_3 не отличалась от таковой для немодифицированного иммобилизованного белка. Это позволяет заключить, что механизм фотоинактивации фермента в присутствии МГ связан с взаимодействием ЛДГ с синглетным кислородом.

Наиболее существенной для потери ферментативной активности ЛДГ является модификация аминокислотных остатков активного центра белка, особенно окисление существенных для катализа остатков гистидина и тирозина, так как действие $^1\text{O}_2$ специфично и ограничивается несколькими типами реакций с ненасыщенными соединениями [8].

В аналогичных условиях функциональная активность свободного фермента ($2 \cdot 10^{-8}$ моль/л) падала на 25 % (концентрация МГ — 10^{-5} моль/л) и 14 % (концентрация МГ — 10^{-6} моль/л). Следовательно, полученные результаты указывают на более высокую степень фотостабильности свободного фермента по сравнению с иммобилизованными тетрамерами и субъединицами в случае их сенсibilизированного повреждения с участием МГ.

Казалось бы, эти данные противоречат представлениям о том, что связывание с матрицей способствует повышению стабильности белковых препаратов. Однако правомерность сопоставления устойчивости свободного фермента с иммобилизованным вызывает серьезные сомнения. Прежде всего, стабильность фермента зависит не только от физических условий, в которых он находится, но и от его концентрации или даже скорее от общей концентрации белка. В гомогенном растворе сво-

бодный фермент функционирует в сильно разбавленном состоянии, тогда как локальная концентрация в иммобилизованном препарате может быть относительно высокой. Вероятно, этим объясняется бóльшая лабильность иммобилизованного фермента по отношению к $^1\text{O}_2$ в условиях его экзогенной генерации: взаимодействие белка с синглетным кислородом эффективно осуществляется лишь при относительно высоких концентрациях первого, так как $^1\text{O}_2$ имеет малое время жизни ($\sim 10^{-6}$ с).

Нельзя исключить и роль матрицы в распределении тиазинового красителя между приповерхностным слоем гранул сефарозы и общей массой раствора, что может способствовать образованию динамических комплексов белок — МГ с переносом энергии триплетного возбужденного состояния с молекул красителя на аминокислотные остатки фермента (фотосенсибилизированные реакции по типу I).

Обобщая полученные результаты, можно заключить, что осуществление процесса диссоциации тетрамера в строго контролируемых условиях: при постоянном наблюдении за активностью фермента и содержанием белка иммобилизованного препарата, использование как можно более низких концентраций мочевины и максимальное сокращение времени обработки позволило получить субъединицы лактатдегидрогеназы, обладавшие удельной активностью 40 ± 5 Е/мг белка, что составляет $\sim 25\%$ от удельной активности исходного иммобилизованного препарата, т. е. их удельные активности идентичны. Это означает, что участие аминокислотных остатков, принадлежащих соседним субъединицам, не является необходимым для формирования активного центра. Белок-белковые контакты в составе олигомера служат для регуляции активности отдельных мономеров, каждый из которых способен функционировать самостоятельно.

Функционирование ферментов-олигомеров может находиться под контролем гетерологических белок-белковых взаимодействий в составе полиферментных комплексов. Молекулярные механизмы подобных эффектов связаны с влиянием на конформационную подвижность белка и характер структурных перестроек, сопровождающих катализ. Функциональное значение образования полиферментных комплексов заключается не только (а может быть и не столько) в том, что это обеспечивает возможность прямого переноса метаболита между активными центрами соседних ферментов, а в создании сложной кооперативной системы

белок-белковых взаимодействий, обеспечивающей более совершенные механизмы регуляции.

Данные, полученные при облучении иммобилизованных препаратов ЛДГ красным светом в присутствии МГ, дополнительно указывают на участие синглетного молекулярного кислорода в процессе фотоинактивации фермента, а также на возможность фотосенсибилизированного окисления этого белка в иммобилизованном состоянии как в олигомерной форме, так и в виде отдельных субъединиц.

Исследование иммобилизованных препаратов фермента обеспечит возможность глубже понять биологический смысл формирования олигомерных структур, роль белок-белковых взаимодействий в функционировании макромолекул, регуляции и организации внутриклеточного метаболизма.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кубе Д. Взаимодействие субъединиц лактатдегидрогеназы из мышц свиньи, выявляемое при образовании комплекса с аддуктом НАД-пируват / Д. Кубе, М. В. Иванов, Н. К. Наградова // Докл. АН СССР. — 1986. — Т. 289, № 4. — С. 996—999.
2. Взаимосвязь между термостабильностью тетрамерной молекулы лактатдегидрогеназы из мышц свиньи и степенью занятости ее активных центров лигандами / Д. Кубе [и др.] // Биохимия. — 1987. — Т. 52, вып. 7. — С. 1116—1125.
3. Наградова Н. К. Белок-белковые взаимодействия в функционировании НАД⁺-зависимых дегидрогеназ / Н. К. Наградова. — М.: Наука, 1990. — 56 с.
4. Golovina T. O. Half-of-the-sites reactivity of rat skeletal muscle D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase / T. O. Golovina, V. I. Muronetz, N. K. Nagradova // Biochim. et biophys. acta. — 1978. — Vol. 524, № 1. — P. 15—25.
5. Ashmarina L. I. Lactate dehydrogenase can function in a monomeric form. The principles of an active subunit preparation / L.I. Ashmarina, V.I. Muronetz, N.K. Nagradova // Biochim. Int. — 1981. — Vol. 3, № 4. — P. 415—423.
6. Kohn J. A new approach (cyanotransfer) for cyanogen bromide activation on sepharose at neutral pH, which yields activated resins, free of interfering nitrogen derivatives / J. Kohn, M. Wilchek // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 1982. — Vol. 107, № 3. — P.878—884.
7. Артюхов В. Г. Активные формы кислорода и степень УФ-модификации структурно-функциональных свойств лактатдегидрогеназы / В. Г. Артюхов, М. А. Наквасина, Ю. А. Лысенко // Радиационная биология. Радиозология. — 1996. — Т. 37, вып. 3. — С. 453—460.
8. Фут Х. Фотосенсибилизированное окисление и синглетный кислород. Биологические следствия / Х. Фут // Свободные радикалы в биологии / Под ред. У. Прайора. — М.: Мир, 1979. — Т. 2. — С. 96—151.

Артюхов Валерий Григорьевич — профессор, заведующий кафедрой биофизики и биотехнологии Воронежского государственного университета; e-mail: artuykhov@bio.vsu.ru

Наквасина Марина Александровна — профессор кафедры биофизики и биотехнологии Воронежского государственного университета; e-mail: artuykhov@bio.vsu.ru

Агишева Наталья Владимировна — аспирант кафедры биофизики и биотехнологии Воронежского государственного университета; e-mail: artuykhov@bio.vsu.ru

Artyukhov Valeriy G. — the professor, head of biophysics and biotechnology department, Voronezh State University; e-mail: artuykhov@bio.vsu.ru

Nakvasina Marina A. — the professor of biophysics and biotechnology department, Voronezh State University; artuykhov@bio.vsu.ru

Agisheva Natalia V. — the post-graduate student of biophysics and biotechnology department; Voronezh State University, artuykhov@bio.vsu.ru