

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ИОНОВ МЕТАЛЛОВ И ИНТЕРМЕДИАТОВ НА АКТИВНОСТЬ ИЗОФОРМ МАЛАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ИЗ БАКТЕРИЙ *RHODOVULUM* *STEPPENSE* ШТАММ А-20S, КУЛЬТИВИРУЕМЫХ ХЕМОТРОФНО В АЭРОБНЫХ УСЛОВИЯХ

М. С. Лященко¹, А. Т. Епринцев¹, М. И. Фалалеева¹, Т. В. Паневина¹,
А. А. Хасан Ахмед¹, Е. И. Компанцева²

¹ ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»

² Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, г. Москва

Поступила в редакцию 23.11.2016 г.

Аннотация. На электрофоретически гомогенных препаратах изоформ малатдегидрогеназы (МДГ) галоалкалофильных пурпурных несерных бактерий *Rhodovulum steppense* штамм А-20s, культивируемых хемотрофно в аэробных условиях роста, проведено изучение регуляции ферментативной активности интермедиатами и катионами. Определены типы и константы ингибирования (активации) для некоторых интермедиатов цикла Кребса и ионов двухвалентных металлов. Выявлены особенности регуляции изоформ малатдегидрогеназы, свидетельствующие об их различной функциональной роли.

Ключевые слова: малатдегидрогеназа, изоформа, *Rhodovulum steppense*, хемотрофное культивирование, очистка, активность, ионы металлов.

Abstract. Using homogenous preparations of malate dehydrogenase isoforms from haloalkaliphilic purple nonsulfur *Rhodovulum steppense* bacteria, strain A-20s, cultivated under chemotrophic aerobic conditions, the effects of metal ions and intermediates on the enzyme activity were studied. The types and the constants of inhibition (activation) for some Krebs cycle intermediates and ions of bivalent metals were determined. The detected regulatory characteristics of malate dehydrogenase isoforms provide their different functional role in the cell.

Keywords: malate dehydrogenase, isoform, *Rhodovulum steppense*, chemotrophic cultivation, purification, activity, metal ions.

Бактерии характеризуются повсеместным распространением и приспособлением к существованию в различных экологических нишах. Изучение возможностей перехода от одних условий существования к другим у галофильных видов представляет определенный научный интерес. Фототрофные галоалкалофильные пурпурные несерные бактерии *Rhodovulum steppense* штамм А-20s способны расти как литоавтотрофно, так и органогетеротрофно на свету и в темноте. Для этих бактерий микроаэробные условия являются оптимальными для роста. Перевод микроорганизмов в аэробные условия среды и отсутствие света замедляют их рост и размножение. В связи с этим

весьма актуальным является изучение адаптационных механизмов ферментных систем при переходе к стрессовым условиям.

Для этих бактерий показано функционирование цикла Кребса (ЦТК), гликолиза и других катаболических путей [1]. Ранее была изучена малатдегидрогеназа из исследуемых бактерий, культивируемых в наиболее благоприятных условиях роста. Выделенный фермент являлся тетрамером с одинаковыми субъединицами [2]. Далее удалось установить, что МДГ (НАД⁺-МДГ, КФ 1.1.1.37) из бактерий, культивируемых хемотрофно в аэробных условиях роста, имел важную структурную особенность: представлял собой гексамер, тетрамер и димер одинаковых субъединиц [3]. В результате многостадийной очистки

были получены препараты изоформ с удельной активностью 4.23 Е/мг белка для первой изоформы. Вторая молекулярная форма МДГ имела 3.88 Е/мг белка, а третья – 4.56 Е/мг белка, при этом степень очистки препаратов энзима составляла 65, 60 и 71 раз, соответственно. Полученные величины констант субстратного ингибирования и K_m для трех изоформ МДГ могут свидетельствовать об их различной функциональной роли [3].

Известно, что данный фермент испытывает регуляторное влияние целого ряда соединений, которые представляют собой интермедиаты клетки и ионы металлов. Они способны влиять на активность и изоферментный состав МДГ различного происхождения. Высокие концентрации ионов двух- и одновалентных металлов, таких как Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ и т. д., могут стабилизировать четвертичную структуру и повышать каталитическую эффективность отдельных изоферментов МДГ [4]. Также ионы металлов могут способствовать присоединению субстрата к активному центру и образованию фермент-субстратного комплекса.

Поэтому целью данной работы являлось изучение влияния ионов металлов и некоторых интермедиатов цикла Кребса на активность изоформ малакдегидрогеназы из бактерий *Rhodovulum steppense* в стрессовых условиях, возникающих при аэробном хемотрофном росте, а также исследование их функциональной роли.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Объектом исследования служили фототрофные галоалкалофильные пурпурные несерные бактерии *Rhodovulum steppense* штамм А-20s (Компанцева Е. И., штамм получен: Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН), культивируемые хемотрофно в аэробных условиях в темноте. Для культивирования микроорганизмов использовали питательную среду Пфеннинга следующего состава (на литр дистиллированной воды): 0.33 г Na_2SO_4 , 0.33 г KCl , 0.33 г NH_4Cl , 0.33 г KH_2PO_4 , 0.33 г $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 10 г $NaCl$, 5 г $NaHCO_3$, 0.3 г $Na_2S \cdot 9H_2O$, 1 г ацетата натрия, 0,1 г дрожжевого экстракта, 1 мл раствора микроэлементов и витаминов – $1.0 \cdot 10^{-3}$ (г/л). Суспензию клеток получали путем центрифугирования культуры при 8000 g и 4° в течение 10 мин. Клетки отмывали 50 мМ трис-НСl-буфером (рН 8.5).

Активность МДГ определяли спектрофотометрически при 340 нм. Для определения скорости восстановления оксалоацетата среда спектрофотометрирования содержала 50 мМ трис-НСl, рН

– 8.5; 1.5 мМ оксалоацетат, 0.15 мМ НАДН. Измерение активности МДГ в прямой реакции проводили в реакционной среде следующего состава: 50 мМ трис-НСl-буфер, рН 8.5; 4 мМ малак; 1 мМ НАД⁺. За единицу ферментативной активности МДГ принимали количество фермента, которое превращало (для обратной реакции) или образовывало (для прямой реакции) 1 мкМ НАДН за 1 мин при 25° .

Очистку фермента осуществляли по модифицированной схеме, включающей получение экстракта фермента, гель-фильтрацию на колонке с сефадексом G-25, ионообменную хроматографию на ДЭАЭ-целлюлозе. Культуры клеток разрушали с помощью ультразвукового дезинтегратора УЗДН-2Т ООО «НПП» Укрросприбор» (Украина) при мощности 500 Вт и частоте 22 кГц в течение 2 мин в ледяной бане. Супернатант получали центрифугированием гомогената при 4000 g и 4° в течение 10 мин. Освобождая от низкомолекулярных примесей, ферментную вытяжку пропускали через колонку (1.5 × 10 см) с сефадексом G-25 «Pharmacia» (Швеция). Объем наносимого образца не превышал 4 мл. После нанесения пробы колонку заполняли буферным раствором (50 мМ трис-НСl-буфер, рН 8.5) и начинали элюирование. Ионообменную хроматографию проводили на колонке (1.5 × 12 см) с ДЭАЭ-целлюлозой «Whatman» (Англия). Десорбцию осуществляли линейным градиентом KCl 220–300 мМ в 50 мМ трис-НСl-буфере, рН 8.0. Фракции собирали по 2 мл и определяли в них активность фермента. Колонки предварительно уравнивали с 50 мМ трис-НСl-буфером. Все стадии проводили при температуре $0-4^\circ$.

Определение белка проводили по методу Лоури.

Регуляторные свойства изоформ МДГ изучали на электрофоретически гомогенных препаратах.

Для определения достоверности результатов исследований применяли метод вариационной статистики. Полученные данные обрабатывали с использованием стандартных статистических методов с помощью критерия Стьюдента. Обсуждаются статистически достоверные различия при $p \leq 0.05$. Для построения графиков использовали данные, обработанные с помощью программ линейной и параболической аппроксимации.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Влияние ионов металлов на ферменты может быть различным. Чаще всего наибольшей эффек-

тивностью обладает Mg^{2+} . В настоящее время установлено участие магния, наиболее широко распространенного катиона во внутриклеточном пространстве, как активатора деятельности энзимов, связанных с образованием и превращением фосфорных соединений, углеводов, органических кислот, белков и жиров.

Результаты наших экспериментов показали, что ионы магния (Mg^{2+}) в концентрациях 0.04-40 мМ активируют все три изоформы фермента по конкурентному типу (рис. 1, 2, 3, табл. 1), что может свидетельствовать о взаимодействии ионов магния непосредственно с активным центром фермента. Были установлены значения величин K_a энзима, составившие: МДГ 1 – 5.076, МДГ 2 – 8.065 и МДГ 3 – 4.7 мМ. Ионы марганца (Mn^{2+}) ингибировали фермент по бесконкурентному типу. Для изоферментов МДГ различного происхождения известно, что ионы Mg^{2+} или ионы Mn^{2+} могут играть роль кофакторов [5].

В биохимических процессах ион Ca^{2+} обычно бывает антагонистом Mg^{2+} . Так, ионы Ca^{2+} пода-

вляют активность многих ферментов, активируемых ионами Mg^{2+} , которые в большинстве случаев являются активаторами внутриклеточных ферментов, а Ca^{2+} – внеклеточных. Так как кальций по своим физико-химическим характеристикам близок к стронцию и барию, то, как правило, ионы Ba^{2+} являются синергистами этого элемента [6].

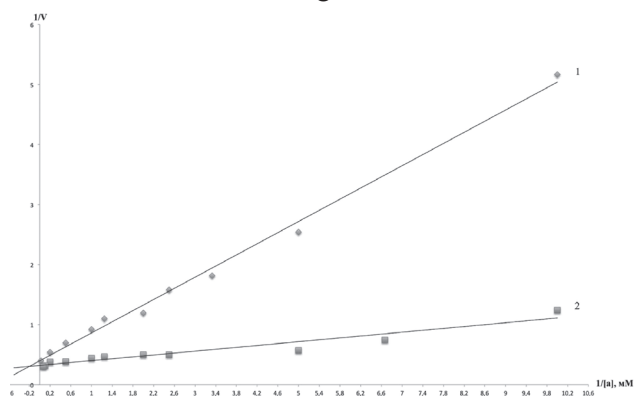


Рис. 1. Влияние ионов магния на активность МДГ 1 из *Rhodovulum steppense*: 1 – 0.05 мМ оксалоацетат; 2 – 0.1 мМ оксалоацетат.

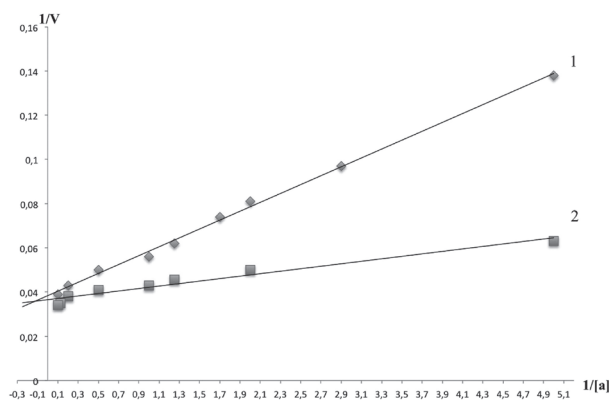


Рис. 2. Влияние ионов магния на активность МДГ 2 из *Rhodovulum steppense*: 1 – 0.05 мМ оксалоацетат; 2 – 0.1 мМ оксалоацетат.

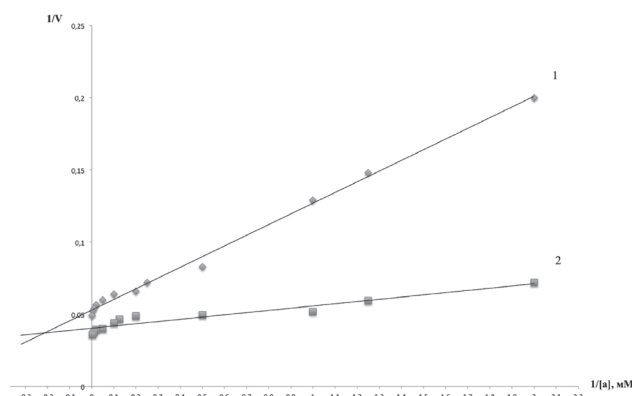


Рис. 3. Влияние ионов магния на активность МДГ 3 из *Rhodovulum steppense*: 1 – 0.05 мМ оксалоацетат; 2 – 0.1 мМ оксалоацетат.

Таблица 1

Регуляторные свойства МДГ из *Rhodovulum steppense* штамм А-20s ($n = 3, p \leq 0,05$)

Свойства	Изоформа 1	Изоформа 2	Изоформа 3
Количество субъединиц	6	4	2
Молекулярная масса, кДа	260	200	92
Влияние ионов:			
$MgCl_2$	Активатор: 0.04-40 мМ	Активатор: 0.04-40 мМ	Активатор: 0.04-40 мМ
$CaCl_2$	Активатор: 0.02-1 мМ	Активатор: 0.02-5 мМ	Активатор: 0.02-0.8 мМ
	Ингибитор: 2-50 мМ	Ингибитор: 5-50 мМ	Ингибитор: 1-50 мМ
$BaCl_2$	Ингибитор: 0.04-40 мМ	Ингибитор: 0.04-40 мМ	Ингибитор: 0.04-50 мМ
$MnCl_2$	Ингибитор: 0.05-50 мМ	Ингибитор: 0.05-50 мМ	Ингибитор: 0.04-40 мМ
Влияние интермедиатов:			
цитрат	Ингибитор: 0.001-2 мМ	Ингибитор: 0.001-2 мМ	Ингибитор: 0.001-2 мМ
сукцинат	Не оказывает влияния: 0.001-5 мМ		

В наших исследованиях удалось установить, что ионы кальция (Ca^{2+}) в пределах концентраций 2-50 (МДГ 1), 5-50 (МДГ 2) и 1-50 мМ (МДГ 3) ингибируют активность малатдегидрогеназы по бесконкурентному типу. При этом ионы кальция в концентрациях до 1 мМ активировали фермент. Для МДГ из исследуемого объекта в условиях хемотрофного роста было выявлено ингибирующее воздействие ионов бария (Ba^{2+}) в концентрациях 0.04-40 мМ по конкурентному типу. Значения K_i (Ba^{2+}) исследуемых молекулярных форм: 11.4 (МДГ 1), 9.2 (МДГ 2) и 16 мМ (МДГ 3).

Известно, что некоторые органические кислоты, представляющие собой субстраты-аналоги малатдегидрогеназы, могут являться конкурентными ингибиторами этого фермента. Другие соединения, как, например, аскорбиновая кислота, сукцинат и масляная кислота, не влияют на его активность [7].

При исследовании действия ряда субстратов ЦТК нам удалось выявить, что сукцинат и изоцитрат в концентрациях 0.001-5 мМ не влияют на активность исследуемого фермента из *Rh. steppense*. Цитрат ингибирует фермент из бактерий *Rh. steppense* в концентрациях 0.001-2 мМ по конкурентному типу (рис. 4, 5, 6).

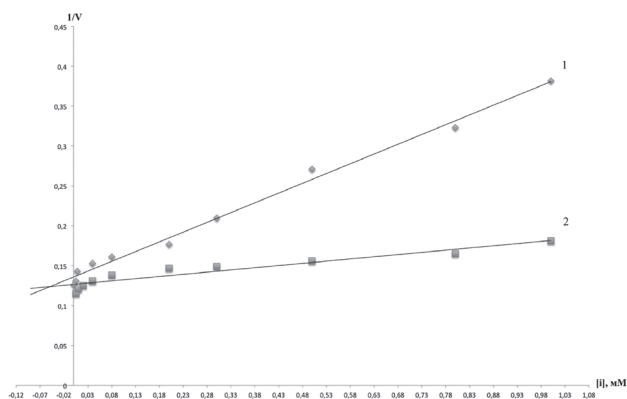


Рис. 4. Определение константы ингибирования цитратом МДГ 1 из бактерий *Rhodovulum steppense*: 1 – 0.05 мМ оксалоацетат; 2 – 0.1 мМ оксалоацетат.

Полученные данные согласуются с результатами для МДГ из *B. leptomitiformis* и *L. mucor*, выращенных органотрофно [8]. Анализ полученных нами данных демонстрирует, что три молекулярные формы энзима обладают неодинаковой устойчивостью к ингибирующему действию высоких концентраций цитрата. Молекулярная форма МДГ 2, участвующая, по нашему мнению, в энергетических реакциях ЦТК, оказывается в большей степени подверженной регуляторному влиянию

данной кислоты, при этом величина константы ингибирования составляет 0.03 мМ. Именно для этой изоформы было показано и самое низкое значение константы субстратного ингибирования оксалоацетатом. Известно, что конкурентное ингибирование МДГ со стороны некоторых карбоновых кислот способствует процессу общего торможения ЦТК, возникающему при избытке макроэргических соединений в клетке [7]. Максимальная устойчивость к цитрату характерна для МДГ 3 ($K_i = 0.4$ мМ), которая, очевидно, обеспечивает протекание глиоксилатного цикла с выходом на конструктивный метаболизм. Выявленные ранее особенности каталитических характеристик (сродство к субстрату, различная устойчивость к оксалоацетату и др.) [3] также служат подтверждением различной функциональной роли изоформ малатдегидрогеназы, индуцируемых в экстремальных условиях культивирования.

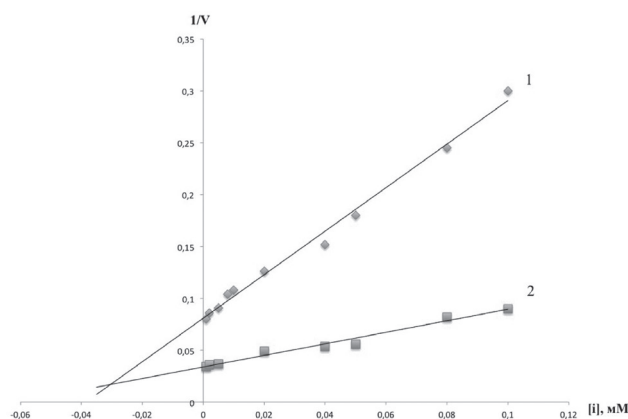


Рис. 5. Определение константы ингибирования цитратом МДГ 2 из бактерий *Rhodovulum steppense*: 1 – 0.05 мМ оксалоацетат; 2 – 0.1 мМ оксалоацетат.

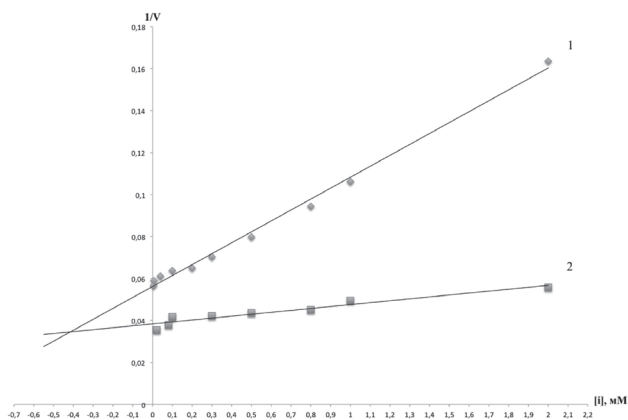


Рис. 6. Определение константы ингибирования цитратом МДГ 3 из бактерий *Rhodovulum steppense*: 1 – 0.05 мМ оксалоацетат; 2 – 0.1 мМ оксалоацетат.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, полученные результаты демонстрируют важную роль ионов металлов и интермедиатов в функционировании трех молекулярных форм МДГ из пурпурных несерных бактерий *Rhodovulum steppense* штамм А-20s, культивируемых хемотрофно в аэробных условиях роста и позволяют сделать вывод об особенностях регуляции отдельных изоформ фермента, участвующих, по-видимому, в работе различных метаболических процессов.

Отсутствие существенных отличий в механизмах регуляции посредством ионов двухвалентных металлов и интермедиатов ЦТК может свидетельствовать о том, что новые выделенные формы МДГ не являются истинными изоферментами, а представляют собой результат посттрансляционной модификации, о чем свидетельствует наличие только одного гена (*mdh*), ответственного за синтез МДГ у исследуемых бактерий. Формирование отдельных изоформ может осуществляться посредством ассоциативно-диссоциативного механизма, что не приводит к существенным изменениям в структуре активных центров исследуемых изоформ.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант №14-14-00721-П)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kompantseva E.I. *Rhodovulum steppense* sp. nov., an obligately haloalkaliphilic purple nonsulfur bacterium widespread in saline soda lakes of Central Asia / E.I. Kompantseva, A.V. Komova, N.A. Kostrikina // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. — 2010. — Vol. 60, No. 5. — P. 1210–1214.

Воронежский государственный университет
Лященко М. С., аспирант кафедры биохимии
и физиологии клетки
Тел.: +7 (473)220-88-77
E-mail: lyaschenko.m@list.ru

Епринцев А. Т., д.б.н., профессор, заведующий
кафедрой биохимии и физиологии клетки
E-mail: bc366@bio.vsu.ru

Фалалеева М. И., к.б.н., доцент кафедры биохимии
и физиологии клетки
E-mail: falaleeva-m-i@yandex.ru

2. Physicochemical, catalytic, and regulatory properties of malate dehydrogenase from *Rhodovulum steppense* bacteria, strain A-20s / A.T. Eprintsev [et al.] // Biology Bulletin. — 2014. — Vol. 41, No. 6. — P. 486–492.

3. Епринцев А.Т., Фалалеева М.И., Лященко М.С. Изоформы малатдегидрогеназы бактерий *Rhodovulum steppense* А-20s, культивируемых хемотрофно в аэробных условиях / А.Т. Епринцев, М.И. Фалалеева, М.С. Лященко // Прикладная биохимия и микробиология. — 2016. — Т. 52, №2. — С. 168–173.

4. Madern D. Molecular adaptation: the malate dehydrogenase from the extreme halophilic bacterium *Salinibacter ruber* behaves like a non-halophilic protein / D. Madern, G. Zaccari // Biochimie. — 2004. — Vol. 86, No. 4–5. — P. 295–303.

5. Индукция пероксисомальной изоформы малатдегидрогеназы в печени крыс при пищевой депривации / В.Н. Попов [и др.] // Биохимия. — 2001. — Т.66, № 5. — С. 617–623.

6. Ершов Ю.А. Общая химия. Биофизическая химия. Химия биогенных элементов / Ю.А. Ершов, В.А. Попков, А.С. Берлянд, А.З. Книжник. — Москва : Высшая школа, 2000. — 560 с.

7. Пине́йру де Корвалью М.А.А. Малатдегидрогеназа высших растений / М.А.А. Пине́йру де Корвалью, А.А. Землянухин, А.Т. Епринцев. — Воронеж : Изд-во Воронеж. ун-та, 1991. — 216 с.

8. Очистка и физико-химические свойства малатдегидрогеназы из бактерий рода *Beggiatoa* / А.Т. Епринцев [и др.] // Биохимия. — 2003. — Т. 68, № 2. — С. 20–21.

Voronezh State University
Lyashchenko M.S., post-graduate student,
Department of biochemistry and physiology of the cell
Ph.: +7 (473) 220-88-77
E-mail: lyaschenko.m@list.ru

Eprintsev A. T., PhD (Biology), D.Sci., Full Professor, head of the department of biochemistry and physiology of the cell
E-mail: bc366@bio.vsu.ru

Falaleeva M.I., PhD (Biology), Associate Professor, Department of biochemistry and physiology of the cell
E-mail: falaleeva-m-i@yandex.ru

*Паневина Т. В., магистрант кафедры биохимии и физиологии клетки
E-mail: tatyana.panevina@mail.ru*

*Хасан Ахмед А. А., аспирант кафедры биохимии и физиологии клетки
E-mail: bc366@bio.vsu.ru*

*Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН
Компанцева Е. И.,
Тел.: 8(499)1240569
E-mail: elenamaxi@mail.ru*

*Panevina T. V., master student, Department of biochemistry and physiology of the cell
E-mail: tatyana.panevina@mail.ru*

*Hasan Ahmed A. A., post-graduate student, Department of biochemistry and physiology of the cell
E-mail: : bc366@bio.vsu.ru*

*S. N. Winogradsky Institute of Microbiology of Russian Academy of Science
Kompantseva E. I.
Ph.: 8(499)1240569
E-mail: elenamaxi@mail.ru*