



УДК 577.151.64

Кинетические характеристики тетрамерной формы малатдегидрогеназы, полученной с использованием ионообменной хроматографии, из животных и бактерий

Сатар А.Ф., Парфенова И.В., Мальцева Е.В.,
Фалалеева М.И., Епринцев А.Т.

ГОУ ВПО «Воронежский государственный университет», Воронеж

Поступила в редакцию 25.12.2009

Аннотация

Получены гомогенные ферментные препараты малатдегидрогеназы из бактерий *Sphaerotilus natans* штамм Д-507, культивируемых миксотрофно, с удельной активностью 2,78 Е/мг белка и 3,37 Е/мг белка, а также из печени крыс с индуцированным аллоксановым диабетом – удельная активность составила: 2,19 Е/мг белка, 1,77 Е/мг белка и 4,29 Е/мг белка. Установлено наличие в исследуемых объектах малатдегидрогеназы, обладающей тетрамерной и димерной структурами. Разделение изоформ фермента произошло на стадии ионообменной хроматографии. Для тетрамерной формы были изучены кинетические характеристики. Выяснили, что ответная реакция организма на изменяющиеся условия существования связана с образованием новых изоформ МДГ.

Ключевые слова: малатдегидрогеназа, изоформы, димер, тетрамер, кинетические свойства

Homogeneous isozymes of malate dehydrogenase (MDH) were purified from bacteria *Sphaerotilus natans* D-507 (with specific activity of 2,78 and 3,37 units/mg protein) and rat liver (with specific activity of 2,19 and 1,77 units/mg protein). Presence of dimeric and tetrameric MDH were determined. Isoforms were separated by ion-exchange chromatography. Kinetic characteristics of tetrameric enzyme were studied. Organism response on changing conditions connects with new isoform formation.

Key words: malate dehydrogenase (MDH), isoforms, dimer, tetramer, kinetic properties

Введение

Метаболические задачи клетки обычно возникают в случае изменения состояния организма или среды его обитания. Решение проблем на уровне макромолекул может быть связано не только с количественными, но и с качественными изменениями ферментов. Так, аминокислотные замены в белках обуславливают появление новых изоферментов, а в особых случаях – и ферментов совсем нового типа [1]. Возможно осуществление адаптивных реакций, протекающих исключительно на фенотипическом уровне. В этом случае может

использоваться только та информация, которая содержалась в геноме. Важная роль в осуществлении подобных реакций организма принадлежит малатдегидрогеназной системе, обеспечивающей протекание конструктивного и энергетического обменов [2].

Обратимое влияние различных факторов на ферменты, состоящие из нескольких субъединиц, может играть важную роль в регуляции, направленной на быстрое и обратимое изменение активности метаболических путей. Известно, например, что в клетках бактерий встречаются как димерные [3], так и тетрамерные формы этого фермента [4; 5]. Ранее было показано, что бактерии родов *Beggiatoa* и *Lecothrix* способны расти как хемоорганогетеротрофно, так и хемолитогетеротрофно, используя в качестве источника энергии органические и неорганические доноры электронов, причем при адаптации к литотрофным условиям, происходило изменение четвертичной структуры молекулы МДГ. В результате осуществлялось перераспределение роли ЦТК и глиоксилатного цикла [2].

Исследуемые бесцветные серобактерии *Sphaerotilus natans* штамм Д-507 также могут в зависимости от наличия в среде тиосульфата изменять тип метаболизма. Определенный интерес представляет исследование структурной организации малатдегидрогеназы в различных условиях культивирования.

У эукариот важнейшими механизмами регуляции является наличие в клетке изоферментов, обладающих отличными свойствами и кодирующихся разными генами или изоформ с различными молекулярными массами [6].

Так, например, инъекция искусственного индуктора сахарного диабета аллоксана является эффективным фактором активации глиоксилатного цикла в печени крыс. В связи с этим интересно изучение возможности участия МДГ в адаптивной реакции организма лабораторных крыс к экспериментальному диабету.

Целью нашей работы было разделение изоформ малатдегидрогеназы из бактерий *Sphaerotilus natans* штамм Д-507 и из печени крыс, получение их в гомогенном состоянии, а также проведение сравнительного анализа физико-химических и кинетических свойств фермента.

Эксперимент

Объектами исследования служили матообразующие бесцветные серобактерии рода *Sphaerotilus natans*, штамм Д-507 культивируемые в условиях миксотрофного роста и самцы беспородных лабораторных крыс *Rattus rattus L.* в возрасте трёх месяцев и массой 180-200г., которые выращивались в виварии при нормальном питании, а затем были инъецированы подкожно 5% аллоксаном (100 мг / кг веса, раствор в 0,9% NaCl). Индукция диабета контролировалась изменением концентрации глюкозы в крови.

Для культивирования микроорганизмов использовали питательную среду следующего состава (мг/л): NH_4Cl - 1.7; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 34.4; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 22.5; CaCl_2 - 27.5; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 0.25; KH_2PO_4 - 8.5; K_2HPO_4 - 21.5; пептон - 200; лактат - 200; дистиллированная вода; pH среды 7.5. Перед посевом в среды вносили раствор микроэлементов и витаминов – 1.0×10^{-3} (г/л) [7]. Для создания миксотрофных условий в среды вносили тиосульфат 1 г/л.

Суспензию клеток бактерий получали путем центрифугирования культуры при 8000 g и 4°C в течение 20 мин. Клетки отмывали 50 mM Tris-HCl-буфером (pH 7.5). Клеточный экстракт получали разрушением бактериальных клеток с помощью

ультразвукового дезинтегратора УЗДН-2Т при мощности 500 Вт и частоте 22 кГц в течение 2 мин на ледяной бане. Супернатант получали после центрифугирования гомогената при 8000 g и 4⁰С в течение 5 мин.

Для получения ткани печени опытных крыс, животных предварительно усыпляли хлороформом и проводили декаптацию. Печень гомогенизировали со средой выделения (1:4) следующего состава: 50 мМ Tris-HCl буфер с рН 7,5; 4мМ MgCl₂; 3мМ ДТТ; 2мМ ЭДТА.

Активность МДГ определяли спектрофотометрически при 340 нм. За единицу активности (Е) принимали количество фермента, катализирующего превращение 1 мкмоль субстрата за 1 мин при 25⁰С. Определение общего количества белка проводили по методу Лоури.

Очистку фермента осуществляли по модифицированной схеме, включающей - получение экстракта фермента, гель-фильтрацию на колонке с сефадексом G-25, ионообменную хроматографию на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой (Whatman, Англия) для бактериальных объектов, и ДЭАЭ-Toyopearl ("Toyosoda", Япония) в случае с животным объектом.

Раствор фермента из бактерий наносили на колонку (1,5×12 см) с ДЭАЭ-целлюлозой. Элюцию осуществляли ступенчатым градиентом KCl 100–110 мМ (для тетрамера МДГ из *S. natans* Д-507), 110–120 мМ (для димера МДГ из *S. natans* Д-507) с шагом ступени 2 мМ в 50 мМ трис-HCl-буфере, рН 7,5 [8]. Фракции собирали по 2 мл и определяли в них активность фермента.

В случае ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-Toyopearl белковую фракцию из печени крыс наносили на колонку (20 x 1 см), уравновешенную 10 мМ Tris-буфером, рН 7,5. Элюцию проводили линейным градиентом KCl от 0 до 300 мМ в той же буферной системе.

Электрофорез проводили по модифицированной методике Дэвиса в 9% полиакриламидном геле [9]. Для специфического проявления малатдегидрогеназы применяли тетразолиновый метод [10]. Для детекции белка использовали методику с нитратом серебра [11].

Обсуждение результатов

Для получения гомогенных препаратов МДГ и разделения изоформ фермента была проведена многостадийная очистка. Хотелось бы отметить значение и применение стадий ионообменной хроматографии. Использование ДЭАЭ-целлюлозы позволило разделить близкие по свойствам изоформы из исследуемых объектов. Ионообменная хроматография позволяла очистить МДГ более чем в 10 раз. Более эффективным оказалось применение ионообменной хроматографии при очистке одной из изоформ МДГ из бактерий при миксотрофном культивировании.

В результате из бактериальных объектов получены ферментные препараты малатдегидрогеназы с удельной активностью 2,78 Е/мг белка и 45-кратной степенью очистки и 3,37 Е/мг белка, при этом степень очистки составила 54 раза (табл.1). Ферментные препараты малатдегидрогеназы из печени крыс с экспериментальным диабетом имели удельную активность 2,19 Е/мг белка, 1,77 Е/мг белка и 4,29 Е/мг белка (степень очистки варьировала от 19 до 37 раз) (табл.2). Ранее в работах нашей кафедры было показано наличие двух изоформ малатдегидрогеназы в гепатоцитах контрольных крыс. Следовательно, можно говорить о явлении индукции дополнительной изоформы данного фермента.

Электрофоретический анализ очищенных препаратов показал, что в геле при универсальном окрашивании на белки проявилось по одной полосе с Rf 0,45 и 0,5 для малатдегидрогеназы из бактерий и по одной полосе с Rf 0,34; 0,22 и 0,15 для МДГ из крыс с индуцированным аллоксановым диабетом. Это свидетельствует о гомогенности малатдегидрогеназы из данных объектов.

На стадии ионообменной хроматографии произошло разделение изоформ фермента и для дальнейшего исследования были выбраны изоформы с величиной Rf 0,45 для бактериальных объектов и Rf 0,15 для МДГ из крыс.

Таблица 1. Схема очистки МДГ из *Sphaerotilus natans* штамм Д-507 в условиях миксотрофного роста

Стадии очистки		Общий объем, мл	Общая активность, Е	Белок, мг/мл	Удельная активность, Е/мг	Степень очистки	Выход, %
Гомогенат		8,9	19,43±0,58	315,0±9,45	0,062±0,001	1	100
Супернатант		5,7	12,44±0,37	201,6±6,04	0,063±0,001	1,02	64
Гель-фильтрация на сефадекс G-25		2,5	10,89±4,06	44,1±1,32	0,247±0,007	1,06	56
Хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе	МДГ ₁	1,0	1,82±0,05	0,653±0,02	2,78±0,08	45	9,4
	МДГ ₂	1,0	1,44±0,04	0,427±0,01	3,37±0,1	54	7,4

Таблица 2. Схема очистки изоформ МДГ из печени крыс с индуцированным аллоксановым диабетом

Стадии очистки	Общий объем, мл		Общая активность, Е	Белок, мг/мл	Удельная активность, Е/мг	Степень очистки	Выход, %
Гомогенат	2,4		5,50±0,17	48,40±1,45	0,11±0,01	1	100
Гель-фильтрация на G-25	2,0		4,48±0,134	12,20±0,37	0,37±0,01	3,2	80,9
Хроматография на ДЭАЭ-Toyopearl	МДГ ₁	3,4	1,18±0,04	0,54±0,02	2,19±0,07	21,3	19,2
	МДГ ₂	3,7	1,38±0,04	0,78±0,02	1,77±0,05	24,9	16,1
	МДГ ₃	3,8	2,40±0,07	0,56±0,02	4,29±0,13	43,3	37,6

Получение препаратов изоформ малатдегидрогеназы в электрофоретически гомогенном состоянии позволило изучить физико-химические и кинетические характеристики фермента. В ходе экспериментов методом Лайнуивера-Берка были определены кинетические константы (K_M) прямой и обратной реакций для МДГ из исследуемых объектов (табл.3). Выявлено разное сродство изоформ фермента к

субстратам. Полученные значения K_m для малатдегидрогеназы из изучаемых объектов свидетельствуют о ее высоком сродстве к оксалоацетату и более низком – к малату, что согласуется с данными других авторов, указывающих на более низкое сродство фермента к этому субстрату, обусловленное конформационными изменениями МДГ при превращении малата [12;13].

Таблица 3. Кинетические и физико-химические характеристики тетрамерной формы МДГ из исследуемых объектов

Свойства	<i>S.natans</i> Д-507 (тетрамер)	МДГ печени крыс (тетрамер)
K_m , мкМ (НАДН)	18±0,54	35±1,1
K_m , мкМ (малат)	204±6,12	866±18,0
K_m , мкМ (НАД ⁺)	75±2,25	120±3,8
pH-оптимум (оксалоацетат)	6,7±0,2	8,7±0,2
pH-оптимум (малат)	8,3±0,3	9,9±0,3

Анализ полученных данных показывает, что в условиях стресса перед организмом возникают новые метаболические потребности, для удовлетворения которых необходимы количественные и качественные перестройки ферментных систем клетки. Адаптивные изменения включают перестройку регуляторных механизмов, что ведет либо к изменению изоферментного спектра, либо к изменению каталитических свойств существующих ферментов, при этом активируются пути, которые в норме функционируют незначительно или вовсе отсутствуют.

Показано, что малатдегидрогеназа при миксотрофном росте бактерий представлена изоэлогическим димером и тетрамером, выполняющими различные функции.

Увеличение активности и появление новой изоформы МДГ в печени крыс при диабете подтверждают возможность участия малатдегидрогеназной системы в адаптивной реакции организма при стрессовых условиях и ее полиморфизм [14].

Таким образом, образование новых изоформ малатдегидрогеназы обеспечивает адекватную реакцию организма на изменения внешней среды, обуславливающие трансформацию метаболизма.

Список литературы

1. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. – М.: Мир, 1982. – Т. 3. – 216 с.
2. Епринцев А.Т., Фалалеева М.И., Грабович М.Ю. и др. Роль изоформ малатдегидрогеназы в регуляции анаболических и катаболических процессов у бесцветных серобактерий *Beggiatoa leptomitiformis* Д-402 // Микробиология. – 2004. – Т. 73, № 4. – С. 437-442.
3. Labrou, N.E., Clonis Y.D. L-Malate dehydrogenase from *Pseudomonas stutzeri*: purification and characterization // Arch. Biochem. Biophys. – 1997. – V. 337, № 1. – P. 103-114.
4. Wynne S.A., Nicholls D.J., Scaven M.D. et. al. Tetrameric malate dehydrogenase from a thermophilic *Bacillus*: cloning, sequence and overexpression of the gene encoding the enzyme and isolation and characterization of the recombinant enzyme // Biochem.J. – 1996. – V.317, №1. – P.235-245.

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

6. Попов В.Н., Волвенкин С.В., Косматых Т.А. и др. Индукция пероксисомальной изоформы малатдегидрогеназы в печени крыс при пищевой депривации // *Биохимия*. – 2001. – Т.66, № 5. – С. 617-623.

7. Дубинина Г.А., Грабович М.Ю., Чурикова В.В. Образование перекиси водорода *Beggiatoa leptomitiformis* // *Микробиология*, 1990. Т.59. С. 425-431.

8. Скоупс Р. Методы очистки белков / Р. Скоупс. – М. : Мир, 1985. 358с.

9. Davis B.J. Disk electrophoresis II-method and application to human serum proteins // *Ann. NY Acad. Sci.*, 1964. V. 121. P. 404-427.

10. Гааль, Э., Медьеша Г., Верецкий Л. Электрофорез в разделении биологических макромолекул. М.: Мир, 1982. 446 с.

11. Shevchenko A., Wilm M., Vorm O. Mass spectrometric sequencing of protein from silver-stained polyarylamide gels // *Anal. Chem.*, 1996. V.68. P. 850-858.

12. Kumar S., Nussinov R. Close-range electrostatic interactions in proteins // *ChemBiochem*. – 2002. – V.3, № 7. – P.604-617;

13. Musrati R.A., Kollarova M., Mernik N. et. al. Malate dehydrogenase: distribution, function and properties // *Gen Physiol Biophys*. – 1998. – V.17, № 3. – P.193-210.

14. Steffan J.S., McAlister-Henn L. Isolation and characterization of the yeast gene encoding the MDH-3 isoenzyme of malate dehydrogenase // *J. Biol. Chem.* – 1992. – Vol.267, №34. – P.24708-24715.

Сатар Абуд Фарис – аспирант, кафедра биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет, Воронеж

Парфенова Ирина Владимировна – асп., кафедра биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет, Воронеж

Мальцева Елена Витальевна – асп., кафедра биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет, Воронеж

Фалалеева Марина Ивановна – к.б.н., кафедра биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет, Воронеж

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

Satar Abud Faris – graduate student, Department of Biochemistry and Cell Physiology Voronezh State University, Voronezh

Parfenova Irina V. – graduate student, Department of Biochemistry and Cell Physiology Voronezh State University, Voronezh

Maltseva Elena V. – graduate student, Department of Biochemistry and Cell Physiology Voronezh State University, Voronezh

Falaleeva Marina I. – Candidate of Biology, Department of Biochemistry and Cell Physiology Voronezh State University, Voronezh

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