



УДК 577.151.32

Выделение изоформ НАД⁺-зависимой малатдегидрогеназы кукурузы хроматографическими методами

© 2021 Гатауллина М.О., Епринцев А.Т.

Воронежский государственный университет, Воронеж

Поступила в редакцию 3.02.2021 г.

DOI: 10.17308/sorpchrom.2021.21/3475

НАД⁺-малатдегидрогеназа (НАД⁺-МДГ, КФ 1.1.1.37) является распространенным ферментом, играющим важную роль во многих метаболитических процессах, таких как ЦТК, азотный обмен и транспорт НАДН. Различные условия среды сильно влияют на активность ферментов, активируя или ингибируя ее. Целью данной работы было исследование изменения активности малатдегидрогеназ при действии различных температур.

В качестве объекта исследования выступали 10-дневные проростки *Zea mays*, выращенные гидропонным методом. Изоферменты малатдегидрогеназ из листьев кукурузы были очищены с помощью четырехстадийной очистки, включавшей в себя стадии гомогенизирования растительного материала, осаждения белка сульфатом аммония в концентрации 25-80% насыщения, гель-фильтрации через сефадекс G-25 и ионообменной хроматографии на колонке, заполненной ДЭАЭ-Sephacel. Элюция проводилась линейным градиентом хлористого натрия в концентрации от 0 до 150 мМ, в процессе которой собирались фракции с малатдегидрогеназной активностью. Измерение активности ферментов проводилось спектрофотометрически по определению скорости образования или расходования НАДН при длине волны 340 нм. Электрофоретические исследования проводили в полиакриламидном геле с последующим универсальным окрашиванием белков нитратом серебра или специфическим проявлением ферментативной активности тетразолиевым методом с индукцией образования нерастворимого диформаза в месте расположения фермента.

Препарат цитоплазматической МДГ характеризовался удельной активностью 256 Е/мг белка и степенью очистки 115. Выход составил 3.5 %. Удельная активность митохондриальной формы исследуемого фермента равнялась 155 Е/мг белка при степени очистки 67 и выходе 2%. Пероксисомальная форма МДГ характеризовалась удельной активностью 180 Е/мг белка, степенью очистки 78 и выходом 1%. Было показано незначительное влияние получасовой инкубации фермента при 7, 15, 30°C. Определены температурные оптимумы для прямой и обратной реакций трех форм малатдегидрогеназ: 25 и 45°C для цитоплазматической и 30 и 45°C для митохондриальной. Температурный оптимум пероксисомальной формы для реакций окисления малата и восстановления оксалоацетата одинаков и равняется 35°C.

Ключевые слова: НАД⁺-малатдегидрогеназа, *Zea mays*, ионообменная хроматография, термостабильность, термолабильность.

Введение

Малатдегидрогеназа (НАД⁺-МДГ, НАД⁺-зависимая оксидоредуктаза, КФ 1.1.1.37) – широко распространенный фермент, катализирующий обратимое

превращение оксалоацетата в малат с использованием НАДН в качестве кофактора и обеспечивающий протекание энергетического и катаболического метаболизма [1,2]. В эукариотических клетках можно найти по крайней мере

две формы данного фермента: цитоплазматическую и митохондриальную МДГ. Однако у некоторых организмов выделяют также третью, глиоксисомальную (пероксисомальную) форму [3-5].

В настоящее время очищенные препараты дегидрогеназ, в том числе МДГ, широко используются в биотехнологии и медицине [6,7]. При этом методики выделения и очистки ферментов постоянно совершенствуются в зависимости от эффективных параметров работы фермента. Таким образом, появляется необходимость исследования таких характеристик малатдегидрогеназы как рН и температурный оптимумы, влияние кофакторов и интермедиантов, стабильность фермента и т.д. В связи с этим, целью данной работы являлось получение хроматографическими методами гомогенных препаратов ферментов и определение их регуляторных свойств при действии различных температур.

Экспериментальная часть

В качестве объекта исследования выступали листья 10-ти дневных проростков *Zea mays* L (сорт – Воронежская 76). Растения были выращены гидропонным методом при температуре 25°C.

Активность МДГ измеряли спектрофотометрически по снижению или увеличению оптической плотности реакционной смеси. Скорость образования или расходования НАДН измеряли при 340 нм на СФ-2000 («Ломо», Россия). Активность МДГ по обратной реакции определяли в среде спектрофотометрирования, содержащей 50 мМ Трис-НСl буфер, рН 8,0, 1,5 мМ оксалоацетат; 0,15 мМ НАДН и 5 мМ хлорид магния. Среда при определении скорости окисления малата состояла из 50 мМ Трис-НСl буфера, рН 9,0, 4 мМ малата натрия и 1 мМ НАД⁺ и 5 мМ хлорида магния.

Единица ферментативной активности фермента равнялась количеству фермента, которое окисляло или восстанавливало 1 мкмоль НАДН за 1 мин при 25°C.

Очистку проводили в четыре этапа. На первом этапе гомогенизировали растительный материал [8]. Далее проводили осаждение белка, которое осуществляли путём добавления сернокислого аммония от 25 до 80% насыщения раствора. Использование сефадекса G-25 («Pharmacia», Швеция) позволило провести очистку энзима от связанных солей и примесей, имеющих низкий молекулярный вес. Проведение ионообменной хроматографии с помощью заполненной колонки ДЭАЭ-Sephacel («GEHealthcare», Швеция), позволило получить белковые фракции, обладающие малатдегидрогеназной активностью. Элюция проводилась линейным градиентом хлористого натрия в концентрации от 0 до 150 мМ [9,10]. Содержание белка определяли колориметрическим методом [11].

Электрофоретические исследования проводили в ПААГ. Гели окрашивали на гомогенность нитратом серебра. Специфическое проявление осуществляли тетразолиевым методом [8].

Исследование температурных оптимумов проводилось спектрофотометрически в интервале от 5 до 70°C для прямой и обратной реакции. Термостабильность препаратов определяли при температурах от 7 до 70°C в течение 30 мин по реакции восстановления оксалоацетата.

Опыты и аналитические определения для каждой пробы осуществляли в трех повторностях. Для статистической обработки использовался критерий Стьюдента с применением поправки Бонферрони на множественные сравнения.

Обсуждение результатов

НАД⁺-зависимая оксидоредуцирующая малатдегидрогеназа, выделенная из листьев кукурузы, локализована в трех компартментах: цитоплазме, митохондриях и пероксисомах.

После четырехстадийной очистки были получены препараты трех форм малатдегидрогеназ: цитоплазматической, митохондриальной и пероксисомальной (рис. 1). При этом, препарат ци-



Рис.1. 3d-модели малатдегидрогеназ кукурузы, выделенных из различных компартментов [18].

Fig. 1. 3d models of maize malate dehydrogenases isolated from various compartments [18]

Таблица 1. Этапы очистки НАД⁺-зависимой малатдегидрогеназы из листьев кукурузы (n=3, p<0,05)

Table 1. Stages of purification of NAD⁺-dependent malate dehydrogenase from maize leaves (n=3, p<0.05)

Стадия	V, см ³	Белок, мг	Общая активность, Е.	Удельная активность, Е/мг белка	Выход, %	Степень очистки
1) Гомогенат	10	64	150	2.3	100	1
2) Фракционирование солями (NH ₄) ₂ SO ₄	1	6.8	47.9	7	32	3
3) Гель-фильтрация через сефадекс G-25	5	6.5	45	6.9	30	3
4) Ионообменная хроматография на ДЭАЭ-SEPНАСЕL	2	0.02	5.3	256	3.5	115
	2	0.02	3.1	155	2	67
	3	0.01	1.8	180	1	78

топлазматической МДГ характеризовался удельной активностью 256 Е/мг белка. Степень очистки равнялась 115. Выход составил 3.5%. Удельная активность митохондриальной формы равнялась 155 Е/мг белка при степени очистки 67 и выходе 2%. Peroxisомальная форма характеризовалась удельной активностью 180 Е/мг белка, степенью очистки 78 и выходом 1%.

Активность фермента зависит от температуры: с одной стороны, чрезмерно высокие температуры снижают ее за счет денатурации белка. С другой стороны, повышение температуры может ускорять образование фермент-субстратного комплекса [12]. При этом, зачастую температурный оптимум зависит от среды обитания изучаемого объекта. Так, например, оптимальная температура растительных и животных ферментов

гораздо ниже, чем оптимум ферментов термофильных бактерий [12-14].

Для прямой реакции малатдегидрогеназы кукурузы из цитоплазмы и митохондрий характерны более низкие температурные оптимумы – 25 и 30°C соответственно. Максимальную скорость обратной реакции цитоплазматическая форма проявляла при 40°C, а митохондриальная форма – при 45°C. Такой сдвиг температурного оптимума указывает на важность прямой реакции и связанных с ней функций фермента, а именно работу цикла Кребса и запасание малата. Температурный оптимум peroxisомальной формы для реакций окисления малата и восстановления оксалоацетата одинаков и равняется 35°C (рис. 2,3).

Термостабильность фермента является важным параметром, который определяет возможность его применения [15-17]. При высоких температурах

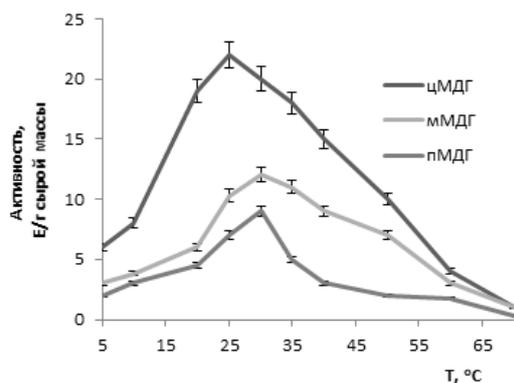


Рис. 2. Определение температурного оптимума малатдегидрогеназы по прямой реакции. цМДГ – цитоплазматическая форма, мМДГ – митохондриальная форма, пМДГ – пероксисомальная форма

Fig. 2. Determination of the temperature optimum of malate dehydrogenase by direct reaction: cMDG – for the cytoplasmic form, mMDG – for the mitochondrial form, pMDG – for the peroxisomal form

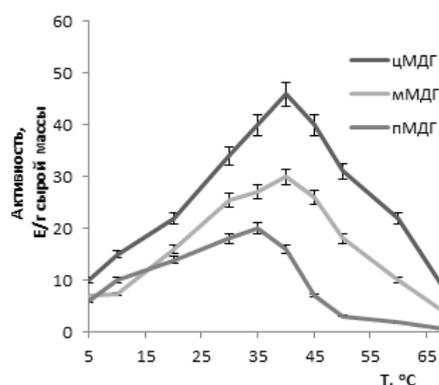


Рис. 3. Определение температурного оптимума малатдегидрогеназы по обратной реакции. цМДГ – цитоплазматическая форма, мМДГ – митохондриальная форма, пМДГ – пероксисомальная форма

Fig. 3. Determination of the temperature optimum of malate dehydrogenase by the reverse reaction: cMDG – for the cytoplasmic form, mMDG – for the mitochondrial form, pMDG – for the peroxisomal form

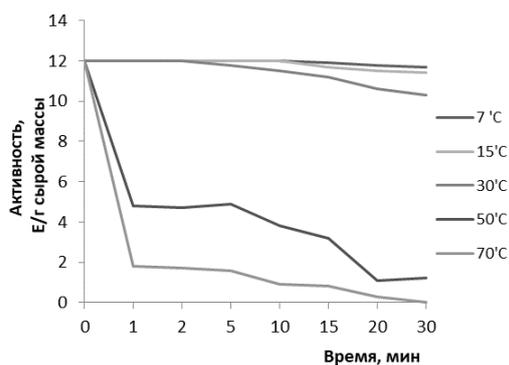


Рис. 4. Изменение активности цитоплазматической МДГ при различных условиях инкубации.

Fig. 4. Changes in the activity of cytoplasmic MDH at following temperatures

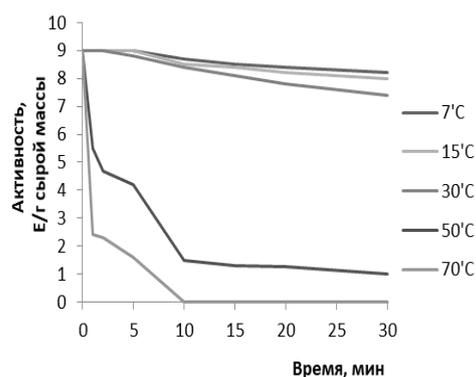


Рис. 5. Изменение активности митохондриальной МДГ при различных условиях инкубации

Fig. 5. Changes in mitochondrial MDH activity at following temperatures

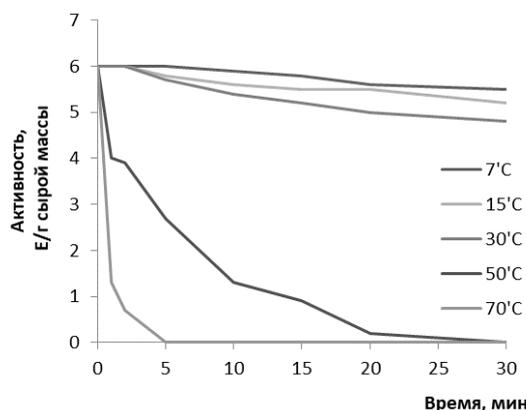


Рис. 6. Изменение активности пероксисомальной МДГ при различных условиях инкубации

Fig. 6. Changes in the activity of peroxisomal MDH at following temperatures

коллоидно-химическая активность ферментов разрушается и в результате они теряют каталитическую активность. Для всех ферментов существуют диапазоны температур, при которых они денатурируют и полностью теряют свою активность. Было показано, что МДГ наиболее стабильна в пределах температур от 0 до 30°C. Температуры выше 50°C приводят к быстрой деградации фермента. При этом, наиболее стабильной является цитоплазматическая форма малатдегидрогеназы, которая выдерживает нагревание фермента до 70°C в течение получаса, в то время как митохондриальная и пероксисомальная формы полностью теряют активность через 10 и 5 минут соответственно (рис. 4-6). Такое различие может быть связано со строением изоферментов. Известно, что малатдегидрогеназы могут быть активны в форме димеров, тетрамеров и олигомеров [1]. Цитоплазматическая форма, в отличие от митохондриальной и пероксисомальной, имеющих димерное строение, является тетрамером [4]. Высказывается предпо-

ложение, что при частичной тепловой денатурации цитоплазматическая МДГ способна распадаться на активные димерные формы.

Заключение

Четырехстадийная ферментативная очистка позволила получить гомогенные препараты различно локализованных изоферментов НАД⁺-малатдегидрогеназы из листьев кукурузы.

Были выявлены температурные оптимумы для цитоплазматической, митохондриальной и пероксисомальной форм МДГ. Показано влияние температуры на активность фермента при инкубации. Интересно отметить, что у различно локализованных изоферментов МДГ определялась разная величина оптимальной температуры. Делается заключение о различной термостабильности и термолабильности цитоплазматической, митохондриальной и пероксисомальной форм малатдегидрогеназ.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания ВУЗам в сфере научной деятельности на 2020-2022 годы, проект № FZGU-2020-0044.

Список литературы

1. Арабцева М.А., Епринцев А.Т., Фалалева М.И., Парфенова И.В. // *Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация*. 2008. № 1. С. 69-73.
2. Юдина Р.С. // *Информационный вестник ВОГиС*. 2010. Т. 14. № 2. С. 243-254.
3. Minarik P., Tomaskova N., Kollarova M., Antalík M. // *General physiology and biophysics*. 2002. Vol. 21. No 3. pp. 257-266.
4. Епринцев А.Т., Гатаулина М.О. // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2018. Т. 54. № 3. С. 299-303.
5. Попов В.Н., Волвенкин С.В., Косматых Т.А., Суад А. и др. // *Биохимия*. 2001. Т. 66. № 5. С. 617-623.
6. Ansari S.A., Husain Q. // *Biotechnology advances*. 2012. Vol. 30. No 3. pp. 512-523.
7. Chang Y.Y., Hung C.H., Hwang T.S., Hsu C.H. // *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*. 2013. Vol. 69. No 11. pp. 1249-1251.
8. Гатаулина М.О., Епринцев А.Т. // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2018. Т. 18. № 1. С. 111-117.
9. Селеменев В.Ф., Рудакова Л.В., Рудаков О.Б., Беланова Н.А. и др. *Фосфолипиды на фоне природных матриц*. Воронеж. Научная книга. 2020. 318 с.
10. Бондарева Л.П., Астапов А.В., Селеменев В.Ф., Ильина А.Ю. // *Журнал физической химии*. 2018. Т. 92. № 8. С. 1323-1328.
11. Lowry O.H. // *J. Biologi*. 1951. Vol. 193. pp. 265-275.
12. Ершова А.Н., Фатуллаева А.С. // *Фундаментальные исследования*. 2014. Т. 11. № 12. С. 2345-2349

13.Новиков В.Ю., Мухин В.А., Рысакова К.С. // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2007. Т. 43. № 2. С. 178-183.

14.Раднагуруева А.А., Лаврентьева Е.В., Будагаева В.Г., Бархутова Д.Д. и др. // *Микробиология*. 2016. Т. 85. № 3. С. 347-360.

15.Мордкович Н.Н., Антипов А.Н., Окорокова Н.А., Сафонова Т.Н. и др. // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2020. Т. 56. № 6. С. 577-586.

16.Судачкова Н.Е., Романова Л.И., Астраханцева Н.В., Новоселова М.В. // *Сибирский лесной журнал*. 2017. № 1. С. 4-14.

17.Халилов Р.А., Джафарова А.М., Хизриева С.И., Абдуллаев В.Р. // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2019. Т. 168. № 9. С. 292-296.

18.SWISS-MODEL. Режим доступа: <https://swissmodel.expasy.org/> (дата обращения: 24.05.2021)

The application of ion-exchange chromatography for the separation of NAD⁺-dependent malate dehydrogenase isoforms from maize for investigation of their thermal stability and thermolability

© 2021 Gataullina M.O., Eprintsev A.T.

Voronezh State University, Voronezh

NAD⁺-malate dehydrogenase (NAD⁺-MDH, EC 1.1.1.37) is a common enzyme playing an important role in many metabolic processes such as TCA, nitrogen exchange and NADH transport. Different environmental conditions strongly affect the activity of enzymes, activating or inhibiting them. The aim of this study was the investigation of the changes in the activity of malate dehydrogenases under the action of various temperatures.

The object of the study was 10-day-old *Zea mays* seedlings grown hydroponically. Malate dehydrogenase isozymes from maize leaves were purified using a four-stage purification, which included the stages of homogenization of plant material, protein precipitation with ammonium sulphate at the saturation of 25-80 %, gel filtration using Sephadex G-25 and ion exchange chromatography on a column packed with DEAE-Sephacel. Elution was carried out with a linear gradient of sodium chloride at a concentration from 0 to 150 mM and the fractions with malate dehydrogenase activity were collected. The measurement of enzyme activity was carried out spectrophotometrically based on the determination of the formation or consumption rate of NADH at a wavelength of 340 nm. Electrophoretic studies were carried out in polyacrylamide gel followed by universal staining of proteins with silver nitrate or a specific staining for enzymatic activity using tetrazolium method with the induction of the formation of insoluble diformazan at the site of the enzyme.

The cytoplasmic MDH preparation had a specific activity of 256 U/mg protein and a purification degree of 115. The yield was 3.5%. The specific activity of the mitochondrial form of the studied enzyme was 155 U/mg protein with a purification degree of 67 and a yield of 2%. The peroxisomal form of MDH was characterized by a specific activity of 180 U/mg protein, the purification degree of 78, and a yield of 1%. An insignificant effect of 30 min incubation of the enzyme at 7, 15, and 30°C was demonstrated. Temperature optima for the direct and reverse reactions of three malate dehydrogenase isoforms were determined: 25 and 45°C for cytoplasmic, 30 and 45°C for mitochondrial isoform. The temperature optimum of the peroxisomal form for the reactions of malate oxidation and oxaloacetate reduction was the same, 35°C.

Keywords: NAD⁺-malate dehydrogenase, *Zea mays*, ion exchange chromatography, thermal stability, thermal stability.

References

1. Arabceva M.A., Eprincev A.T., Falaleeva M.I., Parfenova I.V., *Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Himiya. Biologiya. Farmaciya*, 2008, No 1, pp. 69-73.

2. Yudina R.S., *Informacionnyj vestnik VOGiS*, 2010, Vol. 14, No 2, pp. 243-254.

3. Minarik P., Tomaskova N., Kollarova M., Antalík M., *General physiology and biophysics*, 2002, Vol. 21, No 3, pp. 257-266.

4. Eprincev A.T., Gataullina M.O., *Prikladnaya biohimiya i mikrobiologiya*, 2018, Vol. 54, No 3, pp. 299-303.
5. Popov V.N., Volvenkin S.V., Kosmatyh T.A., Suad A. et al., *Biohimiya*, 2001, Vol. 66, No 5, pp. 617-623.
6. Ansari S.A., Husain Q., *Biotechnology advances*, 2012, Vol. 30, No 3, pp. 512-523.
7. Chang Y.Y., Hung C.H., Hwang T.S., Hsu C.H., *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 2013, Vol. 69, No 11, pp. 1249-1251.
8. Gataullina M.O., Eprincev A.T., *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*, 2018, Vol. 18, No 1, pp. 111-117.
9. Selemenev V.F., Rudakova L.V., Rudakov O.B., Belanova N.A. et al., Fosfolipidy na fone prirodnyh matric, Voronezh, Nauchnaya kniga, 2020, 318 p.
10. Bondareva L.P., Astapov A.V., Selemenev V.F., Il'ina A.YU., *Zhurnal fizicheskoy himii*, 2018, Vol. 92, No 8, pp. 1323-1328.
11. Lowry O.H., *J. Biologi.*, 1951, Vol. 193, pp. 265-275.
12. Ershova A.N., Fatullaeva A.S., *Fundamental'nye issledovaniya*, 2014, Vol. 11, No 12, pp. 2345-2349.
13. Novikov V.YU., Muhin V.A., Rysakova K.S., *Prikladnaya biohimiya I mikrobiologiya*, 2007, Vol. 43, No 2, pp. 178-183.
14. Radnagurueva A.A., Lavrent'eva E.V., Budagaeva V.G., Barhutova D.D. et al., *Mikrobiologiya*, 2016, Vol. 85, No 3, pp. 347-360.
15. Mordkovich N.N., Antipov A.N., Okorokova N.A., Safonova T.N. et al., *Prikladnaya biohimiya i mikrobiologiya*, 2020, Vol. 56, No 6, pp. 577-586.
16. Sudachkova N.E., Romanova L.I., Astrahanceva N.V., Novoselova M.V., *Sibirski jlesnoj zhurnal*, 2017, No 1, pp. 4-14.
17. Halilov R.A., Dzhafarova A.M., Hizrieva S.I., Abdullaev V.R., *Byulleten' eksperimental'noj biologii i imediciny*, 2019, Vol. 168, No 9, pp. 292-296.
18. SWISS-MODEL. Режим доступа: <https://swissmodel.expasy.org/> (дата обращения: 24.05.2021)

Гатауллина Марина Олеговна – ассистент, кафедра биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет, Воронеж

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

Gataullina Marina O. – assistant, Department of Biochemistry and Physiology, Voronezh State University, Voronezh, E-mail: mari-na.gataullina@gmail.com

Eprintsev Alexander T. – Doctor of Biology, Department of Biochemistry and Physiology, Voronezh State University, Voronezh, E-mail: bc366@bio.vsu.ru