



## ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 577.152.4

doi: 10.17308/sorpchrom.2022.22/9338

### **Физико-химические и каталитические свойства изоферментов аконитатгидратазы, полученных с помощью хроматографических методов, из печени крыс**

**Наталья Владимировна Селиванова, Александр Трофимович Епринцев**<sup>✉</sup>

Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия, bc366@bio.vsu.ru <sup>✉</sup>

**Аннотация.** Целью работы было получение с помощью хроматографических методов гомогенных изоферментов аконитатгидратазы (аконитаза, АГ, КФ 4.2.1.3), локализованных в митохондриях и цитоплазме гепатоцитов крыс, и изучение их физико-химических и каталитических свойств. Активность аконитазы определяли спектрофотометрически (при 240 нм). Для получения гомогенных препаратов АГ фермент очищали с использованием хроматографических способов, включающих на несколько этапов (высаливание гомогената сульфатом аммония, обессоливание или гель-фильтрация через сефадекс G-25 и ионообменная хроматография на ДЭАЭ-Тоуорpearl и гель-хроматография на сефадексе G-200). Чистоту выделенных ферментных препаратов оценивали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле. Белок в пробах измеряли по Лоури. Величину молекулярной массы АГ определяли методом денатурирующего электрофореза по Лэммли. Универсальное окрашивание белков проводили нитратом серебра. С целью подтверждения соответствия выделенных белков изоферментам аконитатгидратазы параллельно осуществляли специфическое проявление геля тетразолиевым методом с добавлением НАФД-изоцитратдегидрогеназы (НАФД-ИДГ) в качестве вспомогательного фермента.

Применение хроматографических методов для очистки АГ из печени крыс *Rattus norvegicus* линии Wistar позволило получить гомогенные ферментативные препараты аконитатгидратазы с удельной активностью цитозольной формы –  $1.736 \pm 0.024$  Е/мг белка, а митохондриальной –  $1.256 \pm 0.018$  Е/мг белка, которые были использованы для исследования физико-химических и кинетических характеристик. Значения молекулярной массы цитоплазматической АГ из гепатоцитов крыс составили  $91 \pm 5.2$  кДа, а митохондриальной –  $81 \pm 4.1$  кДа. Выявлено, что обе формы аконитазы являются гомодимерами. Величина молекулярной массы (Мг) субъединиц составляет 45 кДа для цитоплазматической фракции и 41 кДа – для АГ из митохондрий. Показано, что кинетические характеристики ферментативной реакции, которые катализируют цитоплазматический и митохондриальный изоферменты аконитатгидратазы, подчиняются уравнению Михаэлиса-Ментен. Установлено, что аконитаза имеет большее сродство к цис-аконитату, чем к цитрату. Показано, что изофермент из цитоплазмы имел рН оптимум  $8.0 \pm 0.1$ , то есть находился в щелочной области по сравнению с АГ из митохондрий ( $7.4 \pm 0.1$ ).

**Ключевые слова:** аконитатгидратаза, *Rattus norvegicus*, очистка, субклеточная локализация, изоферменты.

**Для цитирования:** Селиванова Н.В., Епринцев А.Т. Физико-химические и каталитические свойства изоферментов аконитатгидратазы, полученных с помощью хроматографических методов, из печени крыс // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2022. Т. 22, № 3. С. 319-326. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2022.22/9338>

Original article

## The physicochemical and catalytic properties of aconitate hydratase isozymes obtained from rat liver by chromatographic methods

Natalia V. Selivanova, Alexander T. Eprintsev<sup>✉</sup>

Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation, bc366@bio.vsu.ru<sup>✉</sup>

**Abstract.** The aim of the study was to obtain homogeneous aconitate hydratase isozymes (aconitase, aconitate hydratase, EC 4.2.1.3) located in the mitochondria and cytoplasm of rat hepatocytes using chromatographic methods, and to study their physicochemical and catalytic properties. Aconitase activity was determined spectrophotometrically (at 240 nm). To obtain homogeneous preparations of aconitase, the enzyme was purified using chromatographic methods involving several steps (salting out the homogenate with ammonium sulphate, desalting or gel filtration using Sephadex G-25, ion exchange chromatography on DEAE Toyopearl, and gel chromatography on Sephadex G-200). The purity of the obtained enzyme preparations was assessed using polyacrylamide gel electrophoresis. The protein in the samples was measured according to Lowry. The molecular weight value of aconitase was determined by denaturing electrophoresis according to the Laemmle's method. The universal protein staining was carried out using silver nitrate. In order to confirm that the isolated proteins corresponded to aconitate hydratase isozymes, we also carried out the specific gel development by tetrazolium method, adding NADP-isocitrate dehydrogenase (NADP-IDH) as a supporting enzyme. Using chromatographic methods for purification of aconitase from the liver of *Rattus norvegicus* Wistar rats, we managed to obtain homogeneous aconitate hydratase enzymatic preparations with specific activity of cytosolic form of  $1.736 \pm 0.024$  U/mg of protein, and of mitochondrial form of  $1.256 \pm 0.018$  U/mg of protein. They were used for the study of physicochemical and kinetic characteristics. The molecular weight of cytoplasmic aconitase from rat hepatocytes was  $91 \pm 5.2$  kDa, and that of mitochondrial aconitase was  $81 \pm 4.1$  kDa. Both forms of aconitase were found to be homodimers. The molecular weight ( $M_r$ ) of the subunits is 45 kDa for the cytoplasmic fraction and 41 kDa for the mitochondrial aconitase. The kinetic characteristics of the enzymatic reaction catalysed by the cytoplasmic and mitochondrial isozymes of aconitate hydratase obey the Michaelis-Menten equation. We determined that aconitase had a higher affinity to cis-aconitate than to citrate. It was shown that the isozyme from cytoplasm had a pH optimum of  $8.0 \pm 0.1$ , i.e., was alkaline compared to the mitochondrial aconitase. ( $7.4 \pm 0.1$ ).

**Keywords:** aconitate hydratase, *Rattus norvegicus*, purification, subcellular localisation, isozymes.

**For citation:** Selivanova N.V., Eprintsev A.T. The physicochemical and catalytic properties of aconitate hydratase isozymes obtained from rat liver by chromatographic methods. *Sorbtionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2022. 22(3): 319-326. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2022.22/9338>

### Введение

Проблемы регуляции метаболизма в животных клетках занимают важное место в развитии биохимии. Печень является многофункциональным органом, имеющим решающее значение для выполнения многочисленных биосинтетических, метаболических и детоксикационных функций. В ее клетках протекает большое количество катаболических и анаболических процессов. В связи с данным фактом, изучение биохимических особенностей функционирования гепатоцитов в норме и при различных патологиях в современном мире набирает все большую популярность [1].

Значимая роль фермента аконитатгидратазы (аконитаза, АГ, КФ 4.2.1.3.) связана с регуляцией метаболизма животных как в норме, так и в стрессовых воздействиях. Известно, что у эукариотических организмов в клетках присутствует два изофермента АГ, локализованные в цитоплазме и митохондриях. Данные формы фермента генетически детерминированы, т.е. кодируются разными генами (*aco1* и *aco2*), что связано с включением АГ в реакции, связанные как с энергетическим, так и с пластическим обменом [2]. Функции каждой изоформы различны [3]. Во многих организмах цитозольная форма фермента участвует в синтезе органических кислот и сахаров за счет своего

включения в глиоксилатный цикл [4, 5]. Кроме того, эта изоформа вносит свой вклад в регуляцию и поддержание гомеостаза железа в клетке, выполняя, таким образом, двойственную функцию [6]. Митохондриальная аконитаза обеспечивает регуляцию цикла Кребса. АГ играет важную роль для изучения физико-химических и каталитических характеристик, являясь энзимом, содержащим железосерный центр, обратимо инактивируемый активными формами кислорода, что позволяет измерять активность АГ в качестве показателя их синтеза [7]. Поэтому активность данного энзима широко используется в качестве биомаркера окислительного стресса и, как было предложено, служит внутримитохондриальным индикатором окислительно-восстановительного статуса [8].

Однако информации о свойствах АГ, обеспечивающей функционирование ЦТК и глюконеогенеза и поддерживающей так называемое «аконитазное равновесие», что обуславливает тонкую регуляцию метаболических процессов в патологических условиях, недостаточно. Поскольку для исследования свойств любого фермента необходимо предварительно получить его в высокоочищенном состоянии, то актуальным остается разработка эффективной схемы очистки, в которой важное место отводят хроматографическим методам, и в первую очередь – ионообменной хроматографии [9]. В связи с этим, целью этой работы явилось получение с помощью хроматографических методов гомогенных изоферментов аконитазы, полученных из митохондрий и цитоплазмы клеток печени крыс, и изучение их физико-химических и каталитических свойств.

### Экспериментальная часть

Объектом для данного исследования служила ткань печени лабораторных крыс *Rattus norvegicus* L. линии Wistar массой 150-200 г, содержащихся в вива-

рии в стандартных условиях без ограничения доступа к корму и воде. Условия эксперимента соответствовали требованиям международных правил гуманного отношения к животным, отражённых в санитарных правилах по отбору и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев). Для получения образцов для исследования на 14 сутки после начала эксперимента крыс усыпляли эфиром, после чего проводили декапитацию. Печень после многократного перфузирования ледяным физиологическим раствором извлекали у животных и использовали для дальнейших исследований.

Навеску ткани печени крыс измельчали в пропорции 1:10 со средой выделения, содержащей 0.1 М Tris-HCl буфер, pH 8.0, 1 мМ трилон Б, 2 мМ хлорид магния, 2 мМ ДТТ, 300 мМ сахарозы. Гомогенат фильтровали, центрифугировали при 5000 г 10 минут и отбирали надосадок, который и использовался в дальнейших исследованиях.

Определение активности фермента проводили по описанной ранее методике [10] на СФ-2000. Метод Лоури использовали для определения концентрации белка в пробах [11]. Электрофорез проводили по методу Дэвиса [12] в 7.5% ПААГ. Для определения субъединичного строения АГ с помощью электрофореза в ПААГ по методу Лэммли в электродный буфер, буфер для проб и среды для заливки гелей добавляли детергент (додецилсульфат натрия) [13]. Калибровочную кривую для измерения молекулярной массы пептидов строили с помощью маркерных белков ( $\beta$ -галактозидаза ( $M_r=116$ ); БСА ( $M_r=66.2$ ); овальбумин ( $M_r=45$ ); ЛДГ ( $M_r=35$ ); рестриктаза Bsp981 ( $M_r=25$ );  $\beta$ -лактоглобулин ( $M_r=18.4$ ); лизоцим ( $M_r=14.4$ )). Универсальное окрашивание белков осуществляли нитратом серебра [14], специфическое проявление аконитатгидратазы проводили с помощью тетразолиевого ме-

тогда с применением НАДФ-изоцитратдегидрогеназы (вспомогательного фермента) [15].

С помощью разработанной ранее схемы очистки, проводимой при  $t=0-4^{\circ}\text{C}$ , получали высокоочищенные препараты АГ [16, 17]. Разделение изоферментов АГ из митохондрий и цитоплазмы проводили методом дифференциального центрифугирования [18]. Белки из полученных цитоплазматической и митохондриальной фракций осаждали сульфатом аммония (35-65% насыщения), обессоливали на колонке с сефадексом G-25 («Pharmacia», Швеция) и наносили на колонку с ДЭАЭ-Тоуорpearl («GE Healthcare», Швеция). Применение ионообменной хроматографии обеспечило получение изоферментов АГ в высокоочищенном состоянии [19]. Для изучения олигомерной структуры и измерения молекулярной массы нативной АГ осуществляли гель-хроматографию через сефадекс G-200 («GE Healthcare», Швеция). В качестве маркерных белков применяли каталазу (120 кДа), БСА – 66.2 кДа, яичный альбумин – 45 кДа, пероксидазу – 44 кДа и цитохром С – 12.3 кДа.

Каталитические характеристики изоферментов аконитазы определяли на электрофоретически гомогенных препаратах. Измерение констант Михаэлиса осуществляли графически, используя график Лайнуивера-Бэрка. Действие рН на каталитическую реакцию определяли путем серии измерений ее скорости при различных концентрациях ионов водорода. Статистический анализ осуществляли с использованием программного обеспечения Microsoft Office Excel 2007 и

программы StatTech v. 1.2.0 (ООО «Статтех», Россия). Обсуждаются статистически достоверные различия при  $p<0.05$ .

### Обсуждение результатов

Для исследования регуляторных особенностей АГ из гепатоцитов крыс осуществлялась очистка цитоплазматической и митохондриальной изоформ. Данные типичных очисток представлены в таблице 1. Белок, выделенный из цитоплазматической фракции, был очищен в 115 раз и проявлял удельную активность  $1.736\pm 0.024$  Е/мг белка, выход составил 6%. Митохондриальную изоформу удалось очистить в 79 раз с удельной активностью  $1.256\pm 0.018$  Е/мг белка и выходом – 6.5%.

Электрофорез в полиакриламидном геле и последующая идентификация нитратом серебра очищенных изоформ из цитоплазмы и митохондрий подтвердили гомогенность белковых препаратов, о чем свидетельствует присутствие на геле по одной полосе с электрофоретической подвижностью 0.7 и 0.62 соответственно (рис. 1). Электрофоретически гомогенные препараты очищенного белка обладали аконитазной активностью, что было выявлено методом специфического проявления.

Исследование физико-химических и каталитических свойств показало значительные отличия у митохондриального и цитоплазматического изоферментов АГ, что позволило установить их роль в регуляции как энергетического, так и конструктивного метаболизма [19]. Величины молекулярной массы цитоплазматической аконитазы из клеток печени

Таблица 1. Сравнительная характеристика очистки цитоплазматической и митохондриальной форм аконитатгидратазы из клеток печени крыс ( $n=10$ ,  $p<0.05$ )

Table 1. Comparative characteristics of the purification of cytoplasmic and mitochondrial forms of aconitate hydratase from rat liver cells ( $n=10$ ,  $p<0.05$ )

Клеточная фракция	Удельная активность, Е/мг белка	Выход, %	Степень очистки
Цитоплазма	$1.736 \pm 0.024$	6	115
Митохондрии	$1.256 \pm 0.018$	6.5	79

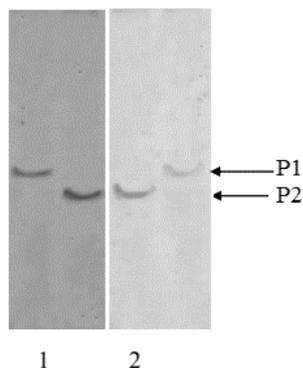


Рис. 1. Электрофореграмма очищенных с помощью хроматографических методов изоферментов аконитатгидратазы из печени крыс. 1 – идентификация АГ нитратом серебра (универсальное окрашивание белков) АГ; 2 – специфическое проявление; P1, P2 – цитоплазматическая и митохондриальная формы фермента, соответственно.

Fig. 1. Electropherogram of chromatographically purified aconitate hydratase isozymes from rat liver. 1: identification of aconitase by silver nitrate (universal protein staining), 2: specific expression, and P1, P2: cytoplasmic and mitochondrial forms of the enzyme, respectively.

крыс, измеренные на сефадексе G-200, составляют  $91 \pm 5.2$  кДа и для митохондриальной –  $81 \pm 4.1$  кДа (рис. 2). Полученные результаты подтверждаются данными литературы: исследуемый показатель у разных организмов колеблется в области 80-100 кДа, причем митохондриальные формы, как правило, имеют меньшие значения, чем цитоплазматические [20-22].

Использование SDS-электрофореза позволило нам определить, что молекулярная масса субъединиц АГ из печени крыс составляет 45 кДа в цитоплазме и 41 кДа в митохондриях (рис. 3). Анализ полученных данных позволяет сделать вывод, что изоферменты АГ из клеток печени крыс состоят из двух одинаковых субъединиц, что подтверждается данными, полученными другими авторами [23, 24].

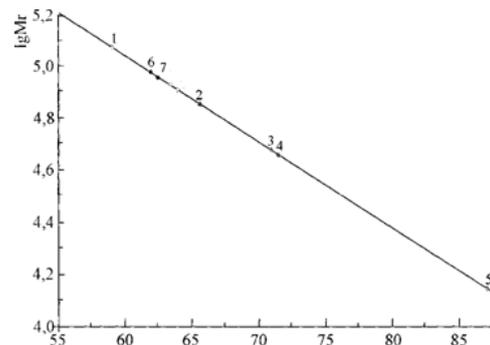


Рис. 2. Измерение величины молекулярной массы изоферментов АГ в гепатоцитах крыс методом гель-хроматографии на G-200: 1 – каталаза; 2 – бычий сывороточный альбумин; 3 – яичный альбумин; 4 – пероксидаза; 5 – цитохром С; 6 – цитоплазматическая изоформа; 7 – митохондриальная изоформа; (n=10, p<0.05).

Fig. 2. Molecular weight measurements of aconitase isozymes in rat hepatocytes by gel chromatography on G-200: 1 – catalase, 2 – bovine serum albumin, 3 – egg albumin, 4 – peroxidase, 5 – cytochrome C, 6 – cytoplasmic isoform, and 7 – mitochondrial isoform; (n=10, p<0.05).

Выявлено, что каталитические свойства аконитазы подчиняются кинетике Михаэлиса-Ментен. Так, рассчитано значение  $K_m$  по цитрату для цитоплазматической изоформы – 93.70 мкМ. Для аконитазы, выделенной из митохондрий, величина  $K_m$  к субстрату составила 24.31 мкМ. При использовании в качестве субстратов изоцитрата и цис-аконитата были установлены намного меньшие величины данной характеристики. Так, по цис-аконитату для изоформы из цитоплазмы  $K_m$  равнялась 14.65 мкМ, а для АГ из митохондрий – 4.20 мкМ. Таким образом, наибольшее сродство АГ характерно для цис-аконитовой кислоты. Эти результаты согласуются и с литературными данными для АГ, выделенной из организмов разных таксономических групп. Для них характерно более высокое сродство к цис-аконитату по сравнению с лимонной и изолимонной кислотами [15, 25, 26].

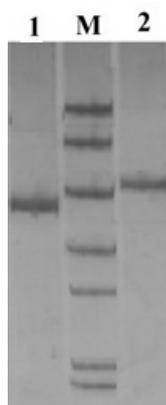


Рис. 3. Результаты электрофореза в ПААГ с добавлением додецилсульфата натрия; М – маркеры ( $\beta$ -галактозидаза ( $M_r=116$ ); бычий сывороточный альбумин ( $M_r=66.2$ ); овальбумин ( $M_r=45$ ); лактатдегидрогеназа ( $M_r=35$ ); рестриктаза Bsp 981 ( $M_r=25$ );  $\beta$ -лактоглобулин ( $M_r=18.4$ ); лизоцим ( $M_r=14.4$ )); 1 – митохондриальная изоформа; 2 – цитоплазматическая изоформа

Fig. 3. Results of electrophoresis in PAGE with addition of sodium dodecyl sulphate. M – the markers ( $\beta$ -galactosidase ( $M_r=116$ ), bovine serum albumin ( $M_r=66.2$ ), ovalbumin ( $M_r=45$ ), lactate dehydrogenase ( $M_r=35$ ), restriction endonuclease Bsp 981 ( $M_r=25$ ),  $\beta$ -lactoglobulin ( $M_r=18.4$ ), lysozyme ( $M_r=14.4$ )), 1 – mitochondrial isoform, and 2 – cytoplasmic isoform

Таблица 2. Каталитические свойства изоформ аконитат гидратазы из клеток печени крыс ( $n=10$ ,  $p<0.05$ )

Table 2. Catalytic properties of aconitate hydratase isoforms from rat liver cells ( $n=10$ ,  $p<0.05$ )

Клеточная фракция	Оптимум pH		$K_m$ по цитрату, мкМ	$K_m$ по цис-аконитату, мкМ	$V_{max}$ , Е
	Трис-НС1 буфер	Натрий-фосфатный буфер			
Цитоплазма	$8.0 \pm 0.2$	$7.4 \pm 0.1$	$93.70 \pm 0.2$	$14.65 \pm 0.07$	$2.06 \pm 0.017$
Митохондрии	$7.6 \pm 0.2$	$7.0 \pm 0.1$	$24.31 \pm 0.4$	$4.20 \pm 0.06$	$0.045 \pm 0.009$

Максимальная скорость ферментативной реакции для АГ1 и АГ2 равнялась  $2.06 \pm 0.017$  Е и  $0.045 \pm 0.009$  Е (субстрат – цитрат).

Исследование значений pH-оптимумов для изоферментов АГ, проведенное на разных буферах, показало, что максимальная активность фермента проявлялась в интервале pH 6.8-8.0 (табл. 2). Установлено, что в щелочной области находится pH оптимум цитозольной формы АГ ( $8.0 \pm 0.1$ ), а для митохондриальной формы этот показатель составляет  $7.4 \pm 0.1$ . Полученные нами результаты согласуются с данными литературы, так при исследовании свойств АГ из печени быка [27] и щитков кукурузы [15] также было показано, что цитозольная форма

имеет более высокий pH-оптимум по сравнению с митохондриальным ферментом.

### Заключение

Таким образом, успешное использование хроматографических методов очистки изоферментов аконитатгидратазы из гепатоцитов крыс позволило выделить электрофоретически гомогенные препараты данного фермента, что открывает перспективы их использования в аналитических измерениях содержания цитрата, цис-аконитата и изоцитрата в биологических образцах, а также в иммуноферментном анализе – для создания специфических антител. Обе изоформы состоят из двух одинаковых субъединиц



с молекулярной массой 45 кДа (цитоплазматическая АГ) и 41 кДа (митохондриальная АГ), что обусловлено генетической детерминацией исследуемого энзима (цитоплазматическая форма кодируется геном *aco1*, а митохондриальная – геном *aco2*).

### Список литературы/References

1. Аyyar V.S., Sukumaran S., DuBois D.C., Almon R.R., Jusko W.J. Modeling Corticosteroid Pharmacogenomics and Proteomics in Rat Liver. *J Pharmacol Exp Ther.* 2018; 367(1): 168-183.
2. Eprintsev A.T., Fedorin D.N., Cherkassikh M.V., Igamberdiev A.U. Regulation of expression of the mitochondrial and cytosolic forms of aconitase in maize leaves via phytochrome. *Plant Physiology and Biochemistry.* 2020; 146: 157-162.
3. Chen X.J., Wang X., Butow R.A. Yeast aconitase binds and provides metabolically coupled protection to mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007; 104(34): 13738-13743.
4. Austin C.M., Wang G., Maier R.J. Aconitase Functions as a Pleiotropic Post-transcriptional Regulator in *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol.* 2015; 197(19): 3076-3086. <https://doi.org/10.1128/JB.00529-15>.
5. Seznec H., Simon D., Monassier L., Criqui-Filipe P., Gansmuller A., Rustin P., Koenig M., Puccio H. Idebenone delays the onset of cardiac functional alteration without correction of Fe-S enzymes deficit in a mouse model for Friedreich ataxia. *Hum Mol Genet.* 2004; 13: 1017-1024.
6. Anderson C.P., Shen M., Eisenstein R.S., Leibold E.A. Mammalian iron metabolism and its control by iron regulatory proteins. *Biochim Biophys Acta.* 2012; 1823(9): 1468-1483.
7. Mashruwala A.A., Boyd J.M. The *Staphylococcus aureus* SrrAB Regulatory System Modulates Hydrogen Peroxide Resistance Factors, Which Imparts Protection to Aconitase during Aerobic Growth. *PLoS One.* 2017; 12(1): e0170283. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170283>

### Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет известных финансовых конфликтов интересов или личных отношений, которые могли бы повлиять на работу, представленную в этой статье.

8. Gardner P.R. Aconitase: sensitive target and measure of superoxide. *Methods Enzymol.* 2002; 349: 9-23.
9. Kosanović M., Milutinović B., Goč S., Mitić N., Janković M. Ion-exchange chromatography purification of extracellular vesicles. *Biotechniques.* 2017; 63(2): 65-71. <https://doi.org/10.2144/000114575>.
10. Eprincev A.T., Popov V.N., Shevchenko M.Yu. Glioksilatnyj cikl: universal'nyj mekhanizm adaptacii? M. Akademkniga. 2007. 228 p. (In Russ.)
11. Mæhre H.K., Dalheim L., Edvinsen G.K., Elvevoll E.O., Jensen I.-J. Protein Determination-Method Matters. *Foods.* 2018; 7(1): 5. <https://doi.org/10.3390/foods7010005>.
12. Chakavarti B., Chakavarti D. Electrophoretic separation of proteins. *J Vis Exp.* 2008; 16: 758. <https://doi.org/10.3791/758>
13. Pollock N.L., Rai M., Simond K.S., Hesketh S.J., Teo A.C.K., Parmar M., Sridhar P., Collins R., Lee S.C., Stroud Z.N., Bakker S.E., Muench S.P., Barton C.H., Hurlbut G., Roper D.I., Smith C.J.I., Knowles T.J., Spickett C.M., East J., Postis M., Dafforn T. R. SMA-PAGE: A new method to examine complexes of membrane proteins using SMALP nano-encapsulation and native gel electrophoresis. *Biochim Biophys Acta Biomembr.* 2019; 1861(8): 1437-1445.
14. Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* 1996; 68: 850-858. <https://doi.org/10.1021/ac950914h>
15. Eprintsev A.T., Fedorin D.N., Nikitina M.V., Igamberdiev A.U. Expression and properties of the mitochondrial and cy-



tosolic forms of aconitase in maize scutellum. *Journal of Plant Physiology*. 2015; 181: 14-19.

16. Semenova E.V., Eprincev A.T., Popov V.N. Indukciya akonitatgidratazy v gepatocitah golodayushchih krys. *Biohimiya*. 2002; 67(7): 959-966. (In Russ.)

17. Selivanova N.V., Moiseenko A.V., Bakarev M.YU., Eprincev A.T. Ispol'zovanie ionoobmennoj hromatografii na DEAE-cellyuloze dlya razdeleniya izofermentov malatdegidrogenazy iz gepatocitov krys v norme i pri alloksanovom diabete. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2021; 21(4): 568-576. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2021.21/3641> (In Russ.)

18. Preble J.M., Pacak Ch.A., Kondo H., MacKay A.A., Cowan D.B., McCully J.D. Rapid isolation and purification of mitochondria for transplantation by tissue dissociation and differential filtration. *J Vis Exp*. 2014; 91: 51682. <https://doi.org/10.3791/51682>

19. Selemenev V.F., Khohlov V.YU., Bobreshova O.V., Aristov I.V. et al. Fiziko-himicheskie osnovy sorbcionnyh i membrannyh metodov vydeleniya i razdeleniya aminokislot. M. Stelajt. 2002. 299 p. (In Russ.)

20. Sriram G., Martinez J.A., McCabe E.R., Liao J.C., Dipple K.M. Single-gene disorders: what role could moonlighting enzymes play? *Am J Hum Genet*. 2005; 76(6): 911-924.

21. Nakano Sh., Fukaya M., Horinouchi S. Enhanced expression of aconitase raises

acetic acid resistance in *Acetobacter aceti*. *FEMS Microbiol Lett*. 2004; 235(2): 315-322. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.05.007>

22. Flint D.H., Allen, R.M. Ironminus signSulfur Proteins with Nonredox Functions. *Chem. Rev*. 1996; 96: 2315-2334.

23. Gruer M.J., Artymiuk P.J., Guest J.R. The aconitase family: three structural variations on a common theme. *Trends Biochem. Sci*. 1997; 22: 3-6. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(96\)10069-4](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(96)10069-4)

24. Gawron O.S., Kennedy M.C., Rauner R.A. Properties of pig heart aconitase. *Biochem. J*. 1974; 143(3): 717-722.

25. Kennedy M.C., Kent T.A., Emptage M., Merkle H., Beinert H., MünckE. Evidence for the formation of a linear [3Fe-4S] cluster in partially unfolded aconitase. *J Biol Chem*. 1984; 259(23): 4463-14471.

26. Uhrigshardt H., Walden M., John H., Anemüller S. Purification and characterization of the first archaeal aconitase from the thermoacidophilic *Sulfolobus acidocaldarius*. *Eur J Biochem*. 2001; 268(6): 1760-1771.

27. Schloss J.V., Emptage M.H., Cleland W.W. pH profiles and isotope effects for aconitases from *Saccharomycopsis lipolytica*, beef heart, and beef liver. alpha-Methyl-cis-aconitate and threo-Ds-alpha-methylisocitrate as substrates. *Biochemistry*. 1984; 23(20): 4572-4580. <https://doi.org/10.1021/bi00315a010>

### Информация об авторах / Information about the authors

**Н.В. Селиванова** – к.б.н., доцент кафедры биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет, Воронеж;

**А.Т. Епринцев** – д.б.н., проф., зав. кафедрой биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет, Воронеж.

**N.V. Selivanova** – Ph.D of Biology, docent of Department of Biochemistry and Physiology, Voronezh State University, Voronezh;

**A.T. Eprintsev** – Doctor of Biology, head of Department of Biochemistry and Physiology, Voronezh State University, Voronezh, e-mail [bc366@bio.vsu.ru](mailto:bc366@bio.vsu.ru)

Статья поступила в редакцию 14.03.2022; одобрена после рецензирования 15.06.2022; принята к публикации 17.06.2022.

The article was submitted 14.03.2022; approved after reviewing 15.06.2022; accepted for publication 17.06.2022.