

УДК 577.3

БИОФИЗИКА

А. Р. Мовсесян, Н. В. Бай, С. С. Оганесян

**Структурная стабильность малатдегидрогеназы
 пшеницы и ее изоферментов**

(Представлено академиком АН Армянской ССР Г. Х. Бунятыном 14/III 1975)

В последние годы установлено, что для большинства олигомерных ферментов характерна тетрамерная или димерная структура (1,2). К ним относится также малатдегидрогеназа (L-малат-НАД-оксидоредуктаза-1.1.1.37) растений (МДГ), состоящая из изоферментов с молекулярным весом 275 000 дальтон (3). Тетрамерную структуру МДГ можно считать термодинамически достаточно стабильной, однако гетерогенность субъединиц определяет неодинаковую структурную устойчивость отдельных изоферментов. Этот вопрос не исследован в достаточной степени для МДГ различных видов растений и их мутантных форм. Нами было предпринято исследование стабильности МДГ пшеницы сорта (Г. Լեսիվանի) «Безостая-1» и ее изоферментов в растворе мочевины возрастающих концентраций. Мочевина является интересным модификатором молекулярной структуры белков в силу своей способности вызывать конформационные перестройки макромолекулы и непосредственно влиять на микроокружение хромофорных остатков (4), что возможно выявить обычными оптическими методами. С этой целью исследовалась зависимость МДГ и ее изоферментов в присутствии 0,1—6,0 М мочевины по изменению оптической плотности в УФ области спектра и интенсивности люминесценции.

Выделение и очистку МДГ из пшеницы проводили согласно (5). Белки из раствора осаждали, используя 95% насыщенное сернокислым аммонием (6). После обессоливания гель-фильтрацией через колонку ДЭАЭ-сефадекса Г-75, уравновешенную 0,01 М фосфатным буфером pH 7,6, содержащим 10^{-2} М 2-меркаптоэтанола, белки фракционировали на колонке, заполненной ДЭАЭ-целлюлозой, уравновешенной 0,01 М фосфатным буфером, с 10^{-2} М 2-меркаптоэтанолом при pH 7,6.

Элюцию белка проводили ступенчатым градиентом 0—0,4 М NaCl. Концентрацию белка определяли методом Кьельдаля.

Оптическую плотность в УФ области спектра регистрировали на спектрофотометре «Спектромом-202». Величина соотношения оптической плотности при двух длинах волны E_{270}/E_{280} растворов МДГ составля-

ла 1,6, что указывает на незначительное содержание пуанленовых кислот в препаратах белка.

Интенсивность и спектр люминесценции регистрировали на спектрофлюорографе «Фэрранд-МК-1» (США). Измерения проводили в кварцевой кювете (1 см) с 0,01 М фосфатным буфером рН 7,6. Длина волны возбуждающего света 280 нм. Все измерения проводили при комнатной температуре.

Исследование светопоглощения колоночных фракций МДГ, элюированных ступенчатым градиентом в области 0,02–0,4 М NaCl выявило сходство абсорбционного спектра с выраженным максимумом поглощения в области 280 нм (рис. 1).

В присутствии возрастающих концентраций мочевины в среде происходит изменение величины светопоглощения в области 280 нм во всех колоночных фракциях МДГ без сдвига максимума (рис. 2). В

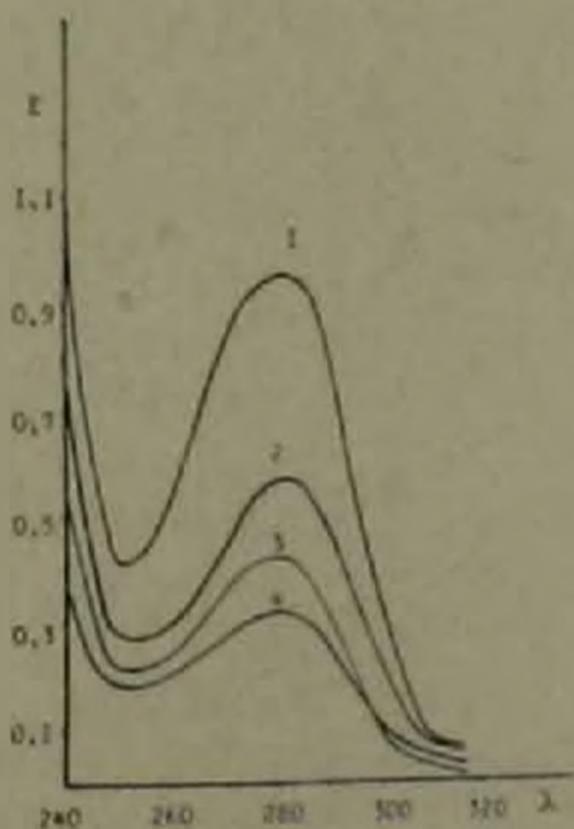


Рис. 1. Спектры поглощения колоночных фракций малатдегидрогеназы, элюируемых разными концентрациями NaCl. 0,01 М фосфатный буфер рН 7,6. 10^{-2} М 2-меркаптоэтанол. 1—0,4 М NaCl; 2—0,2 М NaCl; 3—0,1 М NaCl; 4—0,2 М NaCl

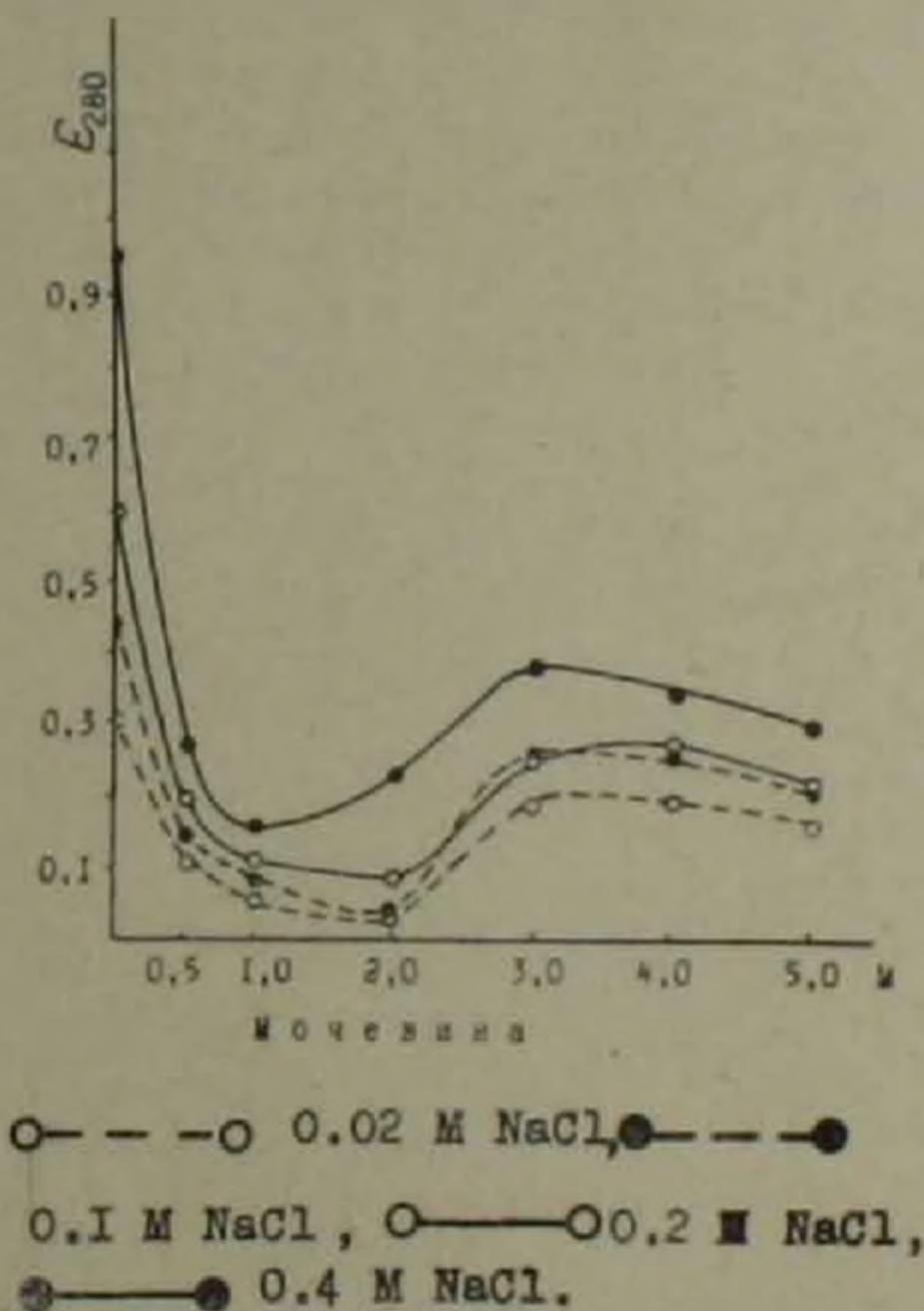


Рис. 2. Зависимость величины максимального светопоглощения колоночных фракций МДГ от концентраций мочевины

присутствии малых концентраций мочевины (0,5–2,0 М) имеет место снижение величины светопоглощения в области максимума, очевидно, из-за локальных изменений при складывании подвижных полипептид-

ных цепей под влиянием органического растворителя. Мочевина в концентрации выше 2,0 М вызывает некоторое повышение оптической плотности белка. Этот эффект можно объяснить распадом тетрамера МДГ на отдельные мономеры с демаскированием соответствующих хромофорных групп, хотя нельзя исключить также деспирализацию макромолекулы фермента в некоторой степени, т. е. частичное его «плавление» под влиянием достаточно высокой концентрации мочевины. Согласно (2), уже в 1,0 М мочевины тетрамер МДГ некоторых растительных организмов распадается на мономеры.

Мочевина как денатурирующий агент в данном случае может действовать двумя способами: при низких концентрациях вызывать разрыв слабых полярных и водородных связей в подвижных участках на уровне четвертичной структуры МДГ и, тем самым, индуцировать локальные сдвиги в малостабилизированных областях макромолекулы; при высоких концентрациях расщеплять тетрамер с развалом четвертичной структуры макромолекулы и с дополнительными изменениями в третичной и вторичной структуре отдельных мономеров, вследствие ослабления гидрофобных взаимодействий. Таким образом, эффект мочевины в зависимости от концентрации можно использовать как тест для исследования стабильности структуры тетрамера МДГ или отдельных мономеров с целью выявления видовых различий, а также мутационных изменений.

Результаты измерения активности препарата МДГ выявили четкую зависимость от концентрации мочевины в среде. Из рис. 3 видно, что сдвиги, вызванные мочевиной в малостабилизированных участках препятствуют аллостерическому кооперативному переходу макромолекулы в новое состояние под влиянием субстрата, что обусловлено небольшими модификациями структуры макромолекулы.

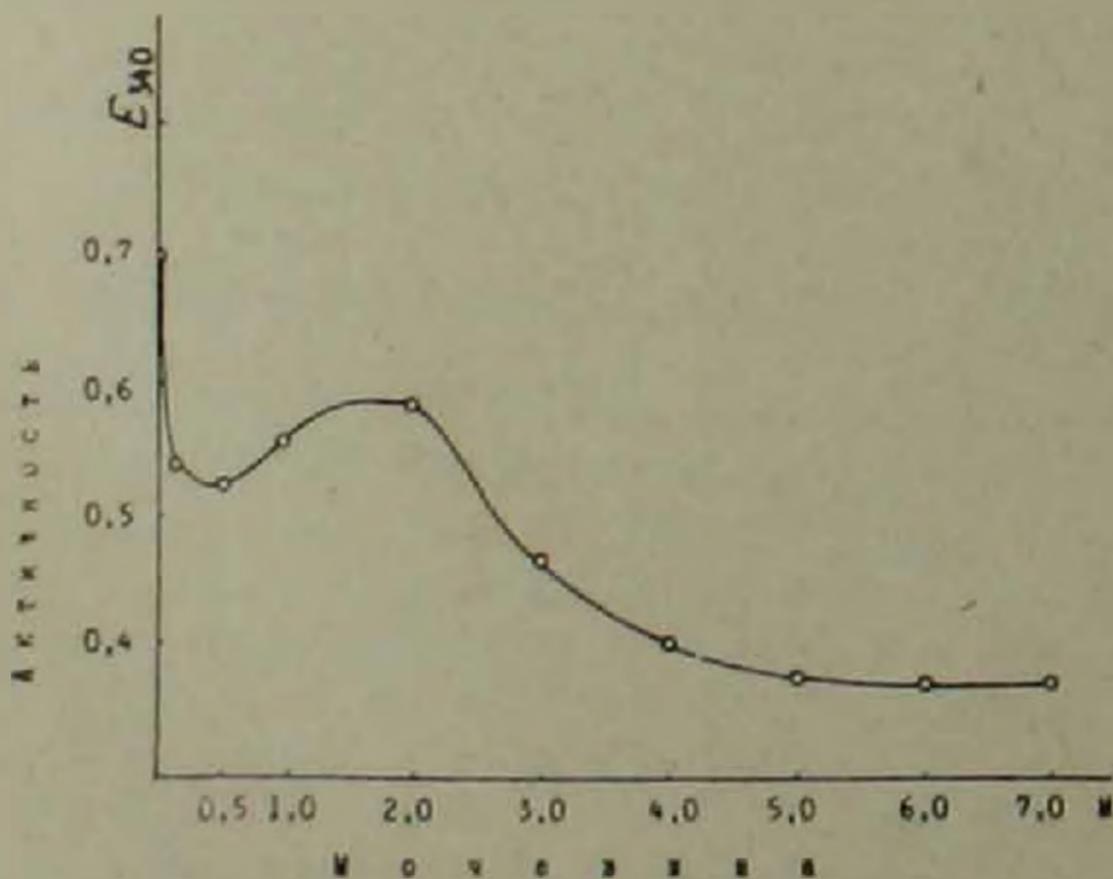


Рис. 3. Зависимость величины каталитической активности смеси колоночных фракций МДГ от возрастающих концентраций мочевины. Буфер фосфатный рН 7,6, 01 М

Мочевина в концентрациях выше 4,0 М вызывает дальнейшее снижение активности фермента, которое не изменяется при повышении ее концентрации выше 5,0 М. Такой тип торможения активности до определенного стабильного уровня, вероятно, объясняется развалом тетрамерной структуры белка, когда минимальная активность обеспечивается раздельным функционированием активных центров на отдельных мономерах, неспособных взаимодействовать друг с другом. Следовательно, результаты исследования влияния мочевины на активность фермента вполне согласуются с результатами исследования ее влияния на кривые оптической плотности растворов МДГ в УФ области.

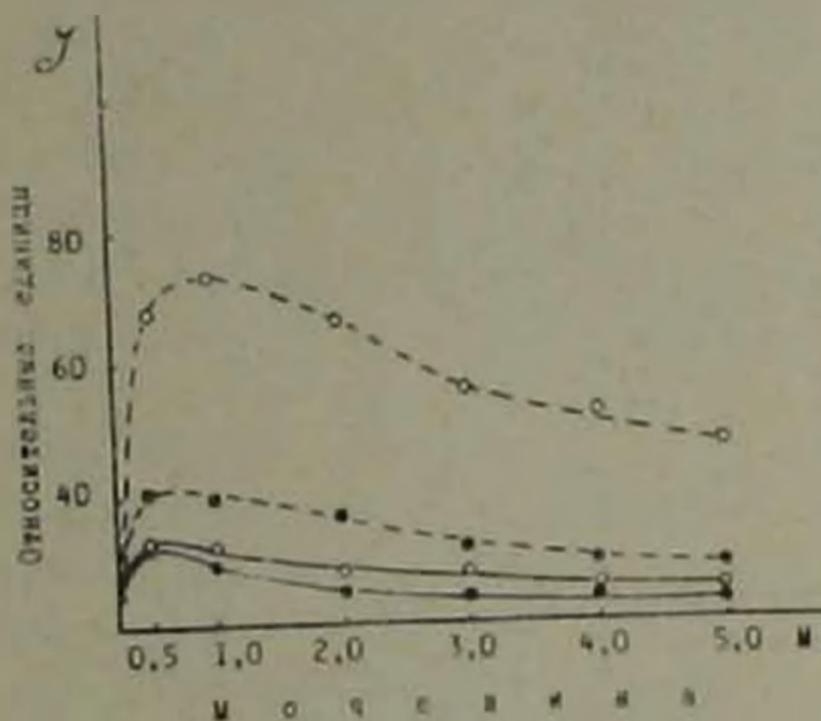


Рис. 4. Зависимость максимальной величины интенсивности люминесценции растворов МДГ (в относительных единицах) от возрастающих концентраций мочевины. Измерение эмиссии в области 335—340 нм. Обозначения те же, что на рис. 2

Возможность появления локальных изменений на уровне четвертичной структуры фермента в присутствии низких концентраций мочевины обнаружена также при исследовании спектров и интенсивности люминесценции препаратов МДГ. Как видно из экспериментов растворы МДГ пшеницы характеризуются спектром люминесценции с максимумом квантовой эмиссии в области 335—340 нм, обусловленном возбуждением остатков тирозина и триптофана в молекуле белка. Важно, что существенных различий в спектре квантовой эмиссии отдельных колоночных фракций не удалось обнаружить. Из рис. 4 видно, что интенсивность люминесценции МДГ в присутствии низких концентраций мочевины повышается. Это увеличение неравномерно для различных колоночных фракций. Наибольшее изменение интенсивности люминесценции наблюдается в колоночной фракции, элюируемой 0,2 М NaCl.

С повышением концентрации мочевины одновременно выявляется сдвиг максимума эмиссии в длинноволновую область (350 нм). Таким образом, в присутствии высоких концентраций мочевины увеличивается доступность триптофановых остатков полярному растворителю. При этом происходит экранировка хромофоров другими частями молекулы, иначе говоря, различные триптофановые остатки оказываются в среде

с разной полярностью. Экранировка уменьшает полярность и спектр эмиссии белков сдвигается в коротковолновую область, по сравнению со спектром индола и триптофана ($^9-^{10}$) в то время, как мочевины, увеличивая полярность среды, вызывает сдвиг максимума люминесценции вправо. Причем, нужно отметить, что для колоночных фракций, величина сдвига максимума в длинноволновую область спектра различна. Для колоночной фракции 0,1 М NaCl, сдвиг максимума не обнаружен. Самое сильное смещение максимума люминесценции наблюдается для колоночной фракции 0,4 М NaCl.

Сравнение результатов измерения величины светопоглощения, ферментативной активности и люминесценции растворов МДГ позволило найти определенную зависимость между изменениями в структуре тетрамера фермента и его активностью в зависимости от концентрации мочевины. Двухфазность кривых указывает на различную природу сил, стабилизирующих четвертичную структуру и структуру отдельных субъединиц. Стабильность тетрамера обеспечивается слабыми межмолекулярными взаимодействиями между субъединицами и небольшие влияния на этом уровне модифицирующего агента сильно снижают активность фермента. При разрушении тетрамера, отдельные субъединицы проявляют достаточно высокую стабильность ферментативной активности в присутствии больших концентраций мочевины, что, по-видимому, обеспечивается гидрофобными взаимодействиями. Обнаруживается также различная устойчивость структуры отдельных изоферментов к органическому растворителю. Таким образом, наблюдаемые различия стабильности смеси изоферментов МДГ к мочевины, обусловлены различным содержанием отдельных изоферментов, обладающих неодинаковой структурной стабильностью. Последнее служит тестом для оценки изоферментного состава МДГ, а также различий в молекулярной структуре отдельных мономеров.

С целью определения изменений в молекулярной гетерогенности МДГ в разных сортах и мутантах пшеницы нами предпринято сравнительное исследование структурной стабильности этого фермента, что является предметом наших последующих публикаций.

Институт экспериментальной биологии
Академии наук Армянской ССР
Институт кардиологии МЗ Армянской ССР

Ա. Ռ. ԽՈՎՈՒՆՅԱՆ, Ն. Վ. ՐԱՅ, Թ. Թ. ՀՈՎՀԱՆՆԻՍՅԱՆ

ՅոսԷնի մալաոդեիդոզենագի և երա իզոֆերմենտների ստրուկտուրային կայունությունը

Ստումնասիրվել է Բեզոստայա — 1 ցորենի մալաոդեիդոզենագի (ՄԴԷ) իզոֆերմենտների կայունությունը 0,1—6,0 մոլ. միզանյութի լուծույթում, որը զնահատվել է օպտիկական խտություն ուղարամանուշակագույն տիրույթ-

ում, ֆերմենտատիվ ակտիվության և յլումինեսցենցիայի սպեկտրի ինտենսիվության փոփոխություններով: Գտնվել է կասյ ֆերմենտի շորրորդային կառուցվածքի և նրա ակտիվության միջև՝ կապված միզանյութի լուծույթի կոնցենտրացիայից: Տեսրամեր ֆերմենտի կայունությունը պայմանավորված է ՄՂՀ-ի ենթամիավորների միջև թույլ միջմոլեկուլյար փոխազդեցությամբ: Միզանյութի ցածր կոնցենտրացիաների ազդեցության պայմաններում արգելակվում է ֆերմենտի ակտիվությունը 30%-ով, իսկ առանձին ենթամիավորները ցուցաբերում են բավականին մեծ կայունություն՝ նույնիսկ միզանյութի բարձր կոնցենտրացիաների ներկայությամբ, որը ըստ երևույթին պայմանավորված է միջմոլեկուլյար իդրոֆոր փոխազդեցությամբ: Հայտնաբերվել է, որ առանձին իդոֆերմենտների կառուցվածքային կայունությունը տարբեր է:

Այսպիսով, միզանյութի նկատմամբ ՄՂՀ-ի նկատվող կայունության տարբերությունները պայմանավորված են առանձին իդոֆերմենտների քանակական հարաբերությամբ: Վերջինս կարող է հանդիսանալ ուղենիշ ՄՂՀ-ի իդոֆերմենտային կազմի գնահատման, ինչպես նաև առանձին մոնոմերների մոլեկուլային կառուցվածքի տարբերության բնորոշման համար:

ЛИТЕРАТУРА — ԿՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

- ¹ Klotz Darnall, Science, 166, 126, 1969. ² J. H. Wilkinson Isoenzymes. London: E. F. N. Spon. Ltd, 1965. ³ H. Edelhoch, R. F. Steiner J. Biol. Chem., 238, 3, 931—938, 1963. ⁴ R. F. Steiner, H. Edelhoch Biochim. Biophys. Acta, 66, 3, 341—355, 1963. ⁵ В. Л. Кремович, З. С. Броковичкая, Т. Н. Курякина, ДАН СССР, 152, 1247 (1967). ⁶ G. K. Honold, M. A. Farkas, Stahmann, Cereal Chem., 45, 5, 17, 1966. ⁷ З. С. Броковичкая, В. Л. Кремович, ДАН СССР, т. 180, №6, 1485 (1968). ⁸ З. С. Броковичкая, В. П. Горетов, «Прикладная биохимия и микробиология» № 3, 707, 1967. ⁹ H. Wilham, D. Racusen, Canad. J. Bot., 46, 5, 719—720 (1968). ¹⁰ P. W. Cowgill Arch Biochem. Biophys., 104, 1, 81—92 (1963). ¹¹ H. Edelhoch, R. F. Steiner 1964. In "Electronic Aspects of Biochemistry", N. Y., London, 7—22, 1964. ¹² В. П. Бобрович, С. В. Конев, ДАН СССР, 155, 197—200 (1964). ¹³ В. П. Бобрович, С. В. Конев, 1965. ДАН БССР, 9, 2, 118—1217 (1965).