

УДК 577.152.161

ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ИЗ КОРНЕЙ ГОРОХА (*Pisum sativum* L.) ПРИ ГИПОКСИИ И ИССЛЕДОВАНИЕ ЕЕ РЕГУЛЯТОРНЫХ СВОЙСТВ

© 2019 г. А. Т. Епринцев¹, Н. Р. Комарова¹, М. И. Фалалеева¹, А. А. Белоглазова¹, *

¹Воронежский государственный университет, Воронеж, 394006 Россия

*e-mail: bc366@bio.vsu.ru

Поступила в редакцию 19.02.2019 г.

После доработки 16.04.2019 г.

Принята к публикации 22.04.2019 г.

В условиях затопления в корнях гороха (*Pisum sativum* L.) повышалась активность лактатдегидрогеназы. В результате многостадийной очистки, включающей фракционирование сульфатом аммония, ионообменную хроматографию на ДЭАЭ-сефацелле и гель-хроматографию на сефадексе G-200 был получен электрофоретически гомогенный фермент со степенью очистки 43.4, выходом 2.5% и удельной активностью 80.5 Е/мг белка. Молекулярная масса нативной молекулы лактатдегидрогеназы – 138 кДа, молекулярная масса субъединиц, определенная методом электрофореза в ПААГ в присутствии ДДС-На, – 34 кДа. Фермент представлял собой гомотетрамер. Установлены кинетические и регуляторные свойства фермента, значения констант Михаэлиса, изучено влияние рН и температуры на катализируемые им прямую и обратную реакции. Установлено, что лактатдегидрогеназа ингибировалась АТФ.

Ключевые слова: лактатдегидрогеназа, гель-хроматография, ионообменная хроматография, электрофорез, гипоксия, кинетика

DOI: 10.1134/S0555109919050039

Лактатдегидрогеназа (ЛДГ, КФ 1.1.1.27) катализирует реакцию взаимопревращения лактата и пирувата, сопровождаемую изменением НАДН и НАД⁺. Этот фермент широко распространен в природе, так как пируват занимает ключевое положение в углеводном обмене. Важной функцией ЛДГ является регуляция соотношения количества НАД⁺ и НАДН, поскольку именно его значение влияет на скорость многих каталитических реакций [1].

В настоящее время достаточно хорошо изучен фермент животных. ЛДГ в органах большинства млекопитающих представлена пятью изоформами [1], каждая из которых является тетрамером и состоит из четырех субъединиц двух типов, мышечной (muscle, М, А) и сердечной (heart, Н, В) локализации. Синтез этих субъединиц контролируется двумя генами — *ldh A* и *ldh B* [2]. Эволюционная значимость появления генных локусов *ldh-A* или *ldh-B*, которые произошли после дубликации единого предка гена *ldh* [3, 4], заключалась в необходимости адаптации животных к условиям среды. Так, присутствие гомотетрамера ЛДГ-5 (4А) наблюдалось в тех тканях, которые испытывают дефицит кислорода (то есть функционируют в анаэробных условиях) [5].

У ЛДГ из разных растений методом электрофореза было обнаружено несколько белковых компонентов, обладающих активностью фермента. Это интерпретировали, как присутствие изоферментов, которые представляли собой тетрамеры, образованные двумя различными пептидными последовательностями [6]. В работе [7] было обнаружено присутствие двух субъединиц в гипоксических корнях и проростках риса.

В настоящее время отсутствуют данные о ее физико-химических свойствах, кинетике и регуляции активности ЛДГ большинства растительных организмов. Поскольку ферментативная утилизация лактата в некоторых из них осуществляется в сопряжении с гликолатоксидазой [8], то для изучения этих свойств необходимо получить электрофоретически гомогенный фермент.

Цель работы – выделение и очистка до электрофоретически гомогенного состояния ЛДГ из корней гороха, выращенного в условиях гипоксии, изучение физико-химических и регуляторных свойств фермента.

МЕТОДИКА

Растительный материал. В качестве объекта исследований использовали 20-суточные проростки гороха (*Pisum sativum* L., сорт Амброзия), выра-

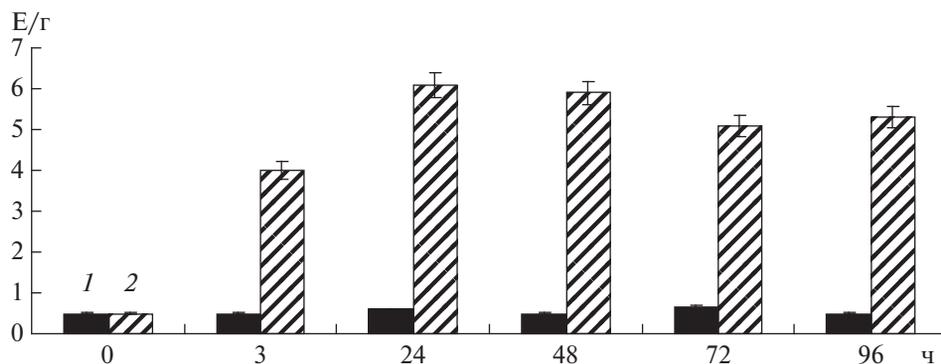


Рис. 1. Динамика активности ЛДГ в корнях гороха в контрольной (1) и экспериментальной (2) группах растений.

щенные гидропонным методом при 25°C. Проростки были погружены в воду на 2–3 см выше корневой шейки для имитации условий дефицита кислорода. Через 72 ч растения были использованы для исследований [9].

Фермент экстрагировали из гомогенизированных корней растений. Экстракт подвергали гель-фильтрации на колонке (1.5 × 20 см) с сефадексом G-25 (“Pharmacia”, Швеция), а затем ионообменной хроматографии на колонке (1.5 × 15 см) с ДЭАЭ-целлюлозой (“GE Healthcare”, Швеция), уравновешенной 50 мМ трис-НСl-буфером, рН 7.4. Целевой белок после элюции линейным градиентом (0.1–0.35 М) NaCl гель-хроматографировали на колонке (2.0 × 30 см) с сефадексом G-200 (“GE Healthcare”, Швеция) по методике, описанной в работах [10, 11].

Для определения активности фермента измеряли скорость окисления НАДН спектрофотометрически при 340 нм на спектрофотометре (“ЛОМО СФ-56”, Россия). Реакционная среда содержала 2 мл 50 мМ трис-НСl-буфера, рН 7.4, 0.06 мМ НАДН и 1 мМ пирувата натрия. Реакцию запускали добавлением пирувата натрия [12]. Активность ЛДГ в прямой реакции измеряли в 50 мМ трис-НСl-буфере, рН 7.4, содержащем 0.5 мМ НАД⁺ и 25 мМ лактата натрия. За единицу ферментативной активности принимали количество фермента, которое в течение 1 мин образовывало (прямая реакция) или превращало (обратная реакция) 1 мкмоль НАДН при 25°C.

Молекулярную массу белка определяли методом гель-фильтрации на колонке с сефадексом G-200, для калибровки которого был использован Dextran blue (2000 кДа). Значение молекулярной массы рассчитывали по формуле

$$\lg M_r = 6.698 - 0.987(V_e/V_0),$$

где V_e – объем элюции белка и V_0 – свободный объем.

Молекулярную массу субъединиц определяли методом электрофореза в 12%-ном ПААГ в присутствии ДДС-Na. В качестве белков-маркеров

молекулярной массы использовали набор стандартных белков, включавший β-галактозидазу (116.0), БСА (66.2), овальбумин (45.0), ЛДГ (35.0), REase Bsp198 (25.0), b-лактоглобулин (18.4) и лизоцим (14.4). Белковые компоненты в геле окрашивали нитратом серебра как описано в работе [13].

Электрофорез ЛДГ также проводили в 8%-ном ПААГ по методу Девиса в неденатурирующих условиях [14]. Для окрашивания белковых компонентов в геле применяли нитрат серебра [13], для специфического определения фермента – тетразолиевый метод [15]. Определение белка проводили по методу Лоури.

Влияние рН на скорость ферментативной реакции изучали в 50 мМ трис-НСl-буфере, рН 5.0–10.0 [6].

Кинетические константы (K_m) прямой и обратной реакций, катализируемых ЛДГ из листьев гороха, были определены методом Лайнуивера–Берка. Каталитические константы K_m для субстратов, пирувата и L-лактата, определяли в стандартной реакционной смеси при рН 7.5 и 25°C. Концентрацию субстратов варьировали от 0 до 60.0 мМ, а количество других компонентов поддерживали постоянным [8].

Влияние температуры на скорость ферментативных реакций ЛДГ изучали в диапазоне температур реакционной смеси от 15 до 80°C.

Эксперименты проводили в 4–6 биологических повторностях, аналитические определения – в трех. В таблице и на рисунках приводятся результаты по средним арифметическим из трех определений. Для расчета их достоверности использовали метод вариационной статистики с помощью критерия Стьюдента. Обсуждаются статистически достоверные различия при $p \leq 0.05$ [16]. Для построения графиков использовали данные, обработанные с помощью программ линейной и параболической аппроксимации.

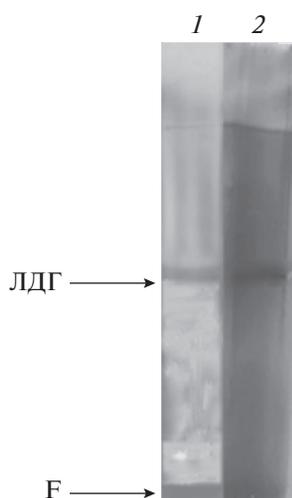


Рис. 2. Электрофорез в ПААГ очищенной лактатдегидрогеназы при pH 7.5. Окраска нитратом серебра (1) и специфическим тетразолиевым синим (2); F – фронт (бромфеноловый синий).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Повышение лактатдегидрогеназной активности в корнях гороха, инкубированных в условиях гипоксии, отмечалось уже через 3 ч от начала эксперимента. Через 2 сут была установлена максимальная активность, которая сохранялась на протяжении 4 сут (рис. 1). Уровень активности фермента увеличился в 11–12 раз по сравнению с контрольными растениями. Можно предположить, что это обусловлено адаптацией метаболизма клеток тканей корня к гипоксии. Ранее подобный эффект был обнаружен у растений сорго [7, 17] и в листьях гороха [18].

Корни гороха, инкубированные в условиях дефицита кислорода в течение 3 сут, были использованы для получения ЛДГ в высокоочищенном состоянии. Результаты очистки ЛДГ из корней гороха приведены в табл. 1.

Полученный методом многостадийной очистки фермент с выходом 2.5% был электрофоретически гомогенен и обладал высокой удельной активностью (80.53 Е/мг белка). При ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе максимальное количество лактатдегидрогеназной активности было десорбировано с сорбента элюцией NaCl (120–150 мМ). При электрофорезе в ПААГ в неденатурирующих условиях был обнаружен один белковый компонент с $R_f = 0.41$, который окрашивался нитратом серебра (рис. 2). Этот компонент взаимодействовал с тетразолиевым синим, с помощью которого идентифицируют специфическую активность ЛДГ (рис. 2). Результаты показали, что полученный препарат ЛДГ был электрофоретически гомогенен и обладал лактатдегидрогеназной активностью. Ранее выделенная и очищенная до электрофоретически гомогенного состояния ЛДГ из листьев гороха имела более высокие показатели степени очистки и выхода, а также большее значение молекулярной массы [18].

Анализ полученных значений молекулярных масс нативной ЛДГ из корней гороха, определенных методом гель-хроматографии на сефадексе G-200, а также проведение электрофореза в ПААГ с ДДС-Na (рис. 3) позволили предположить, что молекула фермента имела четвертичную структуру. На основании значения молекулярной массы нативной молекулы 138 кДа и молекулярной массы субъединицы, равной 34 кДа, можно заключить, что молекула ЛДГ из корней гороха аналогично молекуле из листьев гороха представляла собой гомотетрамер [18].

Определение каталитических характеристик очищенной ЛДГ показало, что значение константы Михаэлиса по пирувату составило 35 мкМ, что свидетельствовало о менее высоком сродстве к субстрату (рис. 4) по сравнению с ЛДГ из листьев гороха [18]. Высокое сродство ЛДГ к пирувату может обеспечить быстрое окисление гликолитического НАДН [19].

Таблица 1. Этапы очистки лактатдегидрогеназы из корней гороха, выросших в условиях гипоксии

Стадии очистки	Общий объем, мл	Общая активность, Е	Белок, мг	Удельная активность, Е/мг	Степень очистки	Выход, %
Супернатант	35	304.5 ± 9.135	164.2 ± 4.92	1.9 ± 0.05	1.0	100
Фракционирование сульфатом аммония (60–80%)	6	91.35 ± 2.74	20.2 ± 0.6	4.5 ± 0.13	2.5	30
Гель-фильтрация через сефадекс G-25	2	60.9 ± 1.8	7.3 ± 0.21	8.4 ± 0.25	4.6	20
Ионообменная хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе	1	8.41 ± 0.25	0.3 ± 0.009	26.1 ± 0.78	14.1	2.8
Гель-хроматография на сефадексе G-200	0.5	7.51 ± 0.23	0.09 ± 0.003	80.53 ± 2.42	43.4	2.5

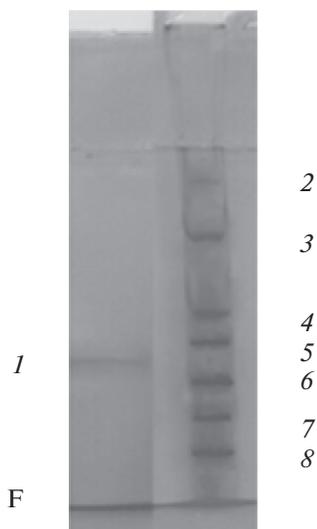


Рис. 3. Электрофорез в ПААГ в присутствии ДДС-Na очищенной лактадегидрогеназы (I). Белки-маркеры молекулярной массы (кДа): 2 – б-галактозидаза (116.0); 3 – БСА (66.2); 4 – овальбумин (45.0); 5 – ЛДГ (35.0); 6 – REase Bsp198 (25.0); 7 – б-лактоглобулин (18.4); 8 – лизоцим (14.4).

Показано, что величина K_m ЛДГ-5 из мышц грудной клетки бентической изоподы (*Saduria entomon*) при использовании в качестве субстрата пирувата составляла 180 мкМ [20], а фермента, экстрагированного из скелетных мышц ящерицы (*Agama stellio*) – 20 мкМ [21]. Величина K_m по НАДН для ЛДГ из корней гороха составила 63 мкМ

(рис. 4), что свидетельствовало о ее достаточно высоком сродстве к данному коферменту. Значение константы для фермента колебалось от 15.6 до 40 мкМ для ЛДГ-5 из мозга свиньи и мышц ящерицы соответственно [21, 22].

Определение кинетических параметров для субстратов обратной реакции выделенной ЛДГ показало значения величин K_m значительно более высокие по сравнению с ферментом из листьев гороха [18]. Так, значение K_m ЛДГ, экстрагированной из корней, по лактату составило 33 мМ, а по НАД – 5.1 мМ (рис. 4). Аналогичные результаты изменения сродства ЛДГ к субстратам обратной реакции были получены и для ферментов из других источников. Так, значения K_m по лактату для ЛДГ из печени варана и бентической изоподы составили 12.4 мМ [23] и 90.04 мМ [20] соответственно, а для НАД⁺ – от 20 мкМ для фермента из мышц ящерицы до 3.2 мМ – печени крыс [21, 24].

Важно отметить, что особенностью 4А типа изоформы ЛДГ является ее ингибирование АТФ. В работе [25] было показано ингибирование ЛДГ-5 из проростков сои 30 мкМ АТФ. Активность ЛДГ из корней гороха частично ингибировалась при внесении 30–60 мкМ АТФ, полностью – при добавлении 240 мкМ АТФ. Полученные данные могли свидетельствовать о принадлежности изучаемого фермента к гомотетрамеру, состоящему из субъединиц А-типа.

Влияние температуры на активность выделенной ЛДГ было изучено в интервале от 15 до 70°C. Температурный оптимум действия фермента в

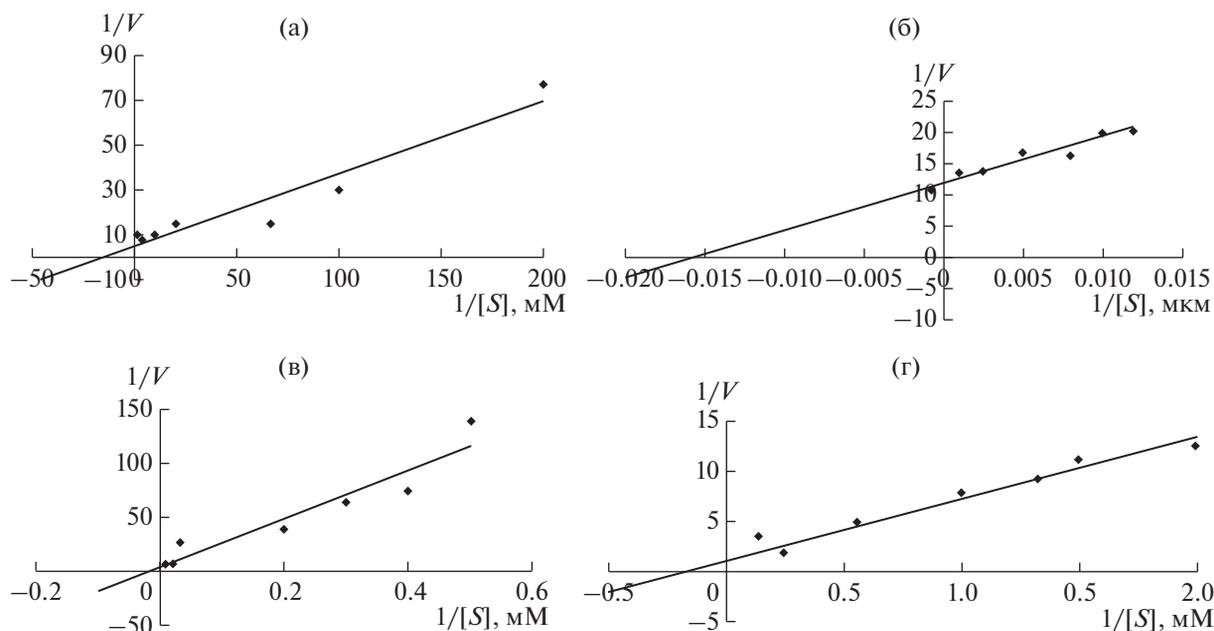


Рис. 4. Определение значений K_m ЛДГ из корней гороха, подверженных кислородному голоданию на протяжении 72 ч: 1 – пируват, 2 – НАДН, 3 – лактат, 4 – НАД⁺.

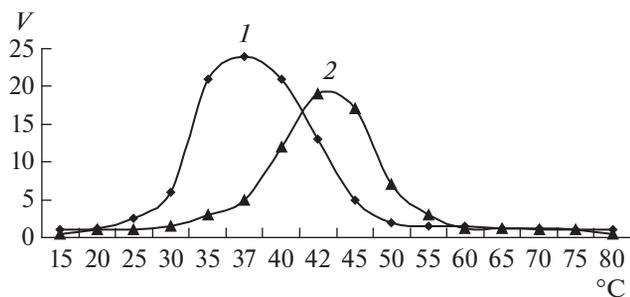


Рис. 5. Влияние температуры на скорость реакции, катализируемой ЛДГ из корней гороха, при восстановлении пирувата (1) и при окислении лактата (2).

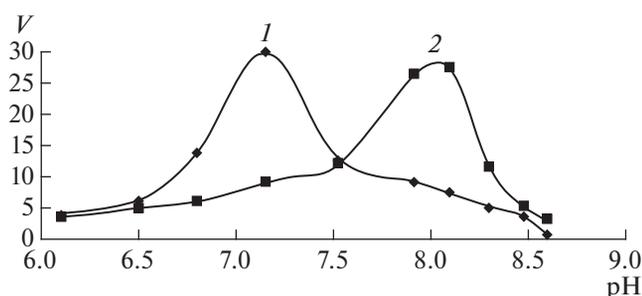


Рис. 6. Зависимость скорости реакции от pH среды для ЛДГ из корней гороха при восстановлении пирувата (1) и при окислении лактата (2).

прямой реакции составил 37°C, а обратной — 42°C (рис. 5). Полученные данные коррелировали с температурными оптимумами ЛДГ из разных организмов, которые, как правило, находятся в пределах 30–60°C [9, 21]. Было также установлено, что диапазон рабочих температур ЛДГ-5 ниже, чем у ЛДГ-1 [22].

Результаты, полученные при изучении влияния концентрации ионов водорода на активность выделенной ЛДГ, показали, что оптимальное значение pH для протекания прямой реакции — 7.2 и для обратной — 8.3 (рис. 6). По данным, опубликованным в работах [23, 25], значения pH 7.5 и 9.5 являются оптимальными для прямой и обратной реакций, катализируемых ЛДГ-5 из печени варана, а уровни pH, соответствующие значениям 6.8 и 9.5, оптимальны для функционирования фермента, выделенного из проростков сои.

Показано, что очищенная ЛДГ полностью сохраняла стабильность при хранении в течение 6 мес. при –74°C, а также при –20°C при добавлении смеси 5 мМ ЭДТА и 5 мМ MgCl₂.

Таким образом, из корней растений гороха, инкубированных в гипоксических условиях, была выделена и очищена до электрофоретически гомогенного состояния ЛДГ. Изучение физико-химических и регуляторных характеристик фер-

мента показало их отличие от других ферментов. В частности для ЛДГ из корней гороха было характерно более высокое сродство к пирувату, по сравнению с лактатом, что обуславливало ее участие в реокислении гликолитического НАДН. Об участии этой ферментативной системы в адаптивной реакции клеточного метаболизма корня может косвенно свидетельствовать тот факт, что для катализа восстановления пирувата оптимальное значение pH равно 7.2, а для окисления лактата — 8.3 [23, 25]. Анализ эффективности ингибирования активности фермента АТФ позволил отнести очищенную ЛДГ к А-типу этих ферментов [25]. Полученные данные открывают перспективы для изучения роли ЛДГ (совместно с ЛДГ, экстрагированной из листьев гороха) в развитии адаптивных реакций клеточного метаболизма к условиям гипоксии, возникающим в корне при затоплении [17].

Работа выполнена при финансовой поддержке государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ (проект № 6.6927.2017/8.9).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Райдер К., Тейлор К. Изоферменты. М.: Мир, 1983. 197 с.
2. Rossignol F., Solares M., Balanza E., Coudert J., Clottes E. // J. Cell Biochem. Physiology. 2003. V. 89. № 1. P. 67–79.
3. Корочкин Л.И., Серов О.Л., Пудовкин А.И., Аронштам А.А., Боркин Л.Я., Малецкий С.И., Полякова Я.В., Манченко Г.П. Генетика изоферментов. М.: Наука, 1977. 275 с.
4. Tsuji S., Qureshi M.A., Hou E.W., Fitch W.M., Li S.S. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1994. V. 91. № 20. P. 9392–9396.
5. Унжаков А.Р., Илюха В.А., Мацук Н.В., Белкин В.В. // Труды КарНЦ РАН. 2007. № 11. С. 118–126.
6. Mulcahy P., O'Carra P. // Phytochemistry. 1997. V. 45. № 5. P. 889–896.
7. Jain V., Singla N.K., Jain S., Gupta K. // Physiol. Mol. Biol. Plants. 2010. V. 16. № 3. P. 241–247.
8. Engqvist M.K.M., Schmitz J., Gertzmann A., Florian A., Jaspert N., Arif M., Balazadeh S., Mueller-Roeber B., Fernie A.R., Maurino V.G. // Plant Physiol. 2015. V. 169. № 2. P. 1042–1061.
9. Rivoal J., Richard B., Pradet A. // Plant Physiol. 1991. V. 95. № 3. P. 682–686.
10. Hoffman N.E., Hanson A.D. // Plant Physiol. 1986. V. 82. № 3. P. 664–670.
11. Eprintsev A.T., Fedorin D.N., Nikitina M.V., Igamberdiev A.U. // Plant Physiol. 2015. V. 181. P. 14–19. (<http://dx.doi.org/>) <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2015.03.012>
12. Setsuko K., Takahiro M., Hiroshi Y. // PLoS One. 2013. V. 8. № 6. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3683008> (дата обращения 15.10.2018)
13. Shevchenko A., Wilm M., Vorm O. // Anal. Chem. 1996. V. 68. № 5. P. 850–858.

14. Davis B.J., Ornstein L. // Ann. N.Y. Acad. Sci. 1964. V. 121. № 2. P. 404–427.
15. Fiedes M.A. // Electrophoresis. 1992. V. 13. № 1–2. P. 82–86.
16. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высш. шк., 1990. 352 с.
17. Narsai R., Whelan J. // Front Plant Sci. 2013. V. 4. P. 349–363. doi 10.3389 / fpls.2013.00349
18. Епринцев А.Т., Комарова Н.Р., Фалалеева М.И. // Прикл. биохимия и микробиология. 2019. Т. 55. № 2. С. 159–164.
19. Zheng Y., Si X., He Q., Jin S., Hong J. // Essays Biochem. 2008. 2015. V. 59. P. 1–41. <https://doi.org/10.1042/bse0590001>
20. Mulkiewicz E., Zietara M.S., Stachowiak K., Skorkowski E.F. // Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol. 2000. V. 126. № 3. P. 337–346.
21. С. Аль-Джасаби // Биохимия. 2002. Т. 67. № 7. С. 786–789.
22. Goto T., Sugawara K., Nakamura S., Kidokoro S., Wakui H., Nunomura W. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2016. V. 479. № 4. P. 860–867.
23. Massod J.H., Syed M.I.A., Abida N.H., Asifa A., Ishaq M. // Exp. Mol. Med. 1997. V. 29. № 1. P. 25–30.
24. Fregoso-Peñuñuri A.A., Valenzuela-Soto E.M., Figueroa-Soto C.G., Peregrino-Uriarte A.B., Ochoa-Valdéz M., Leyva-Carrillo L., Yepiz-Plascencia G // Protein. Expr. Purif. 2017. V. 137. P. 20–25. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28625911>
25. Tihanyi K., Fontanell A., Talbot B., Thiron J.P. // Arch. Biochem. Biophys. 1989. V. 274. № 2. P. 626–632.

Isolation and Cleaning of Lactate Dehydrogenase from Roots of the Pea (*Pisum sativum* L.) in Hypoxia and Investigation of Its Regulatory Properties

A. T. Eprintsev^a, N. R. Komarova^a, M. I. Falaleeva^a, and A. A. Beloglazova^{a,*}

^aVoronezh State University, Voronezh, 394018 Russia

*e-mail: bc366@bio.vsu.ru

Received February 19, 2019; revised April 16, 2019; accepted April 22, 2019

Placing pea plants (*Pisum sativum* L.) under flooding conditions led to an increase in lactate dehydrogenase (EC 1.1.1.27) activity in the roots. Using a multistage purification method, including ammonium sulfate fractionation, ion exchange chromatography on DEAE-Sephacel and gel chromatography on Sephadex G-200, the enzyme was purified to an electrophoretic homogeneous state. The degree of its purification was 43.4 times, the yield was 2.5%, and the specific activity was 80.5 U/mg protein. Its physicochemical properties were studied: the molecular weight of the native lactate dehydrogenase molecule was 138 kDa. The molecular weight of the subunits was determined by PAGE by electrophoresis in the presence of DDS-Na, and its value was 34 kDa, which indicates that the enzyme is a homotetramer. Established kinetic and regulatory properties of the enzyme. The values of the Michaelis constants, the effect of the concentration of hydrogen ions and the temperature on its direct and reverse reactions are obtained. Inhibition of ATP lactate dehydrogenase has been established.

Keywords: lactate dehydrogenase, purification, gel chromatography, ion exchange chromatography, electrophoresis, hypoxia, subunit, kinetics