

УДК 577.151.32

КИНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НАДФ⁺-ЗАВИСИМОЙ ДЕКАРБОКСИЛИРУЮЩЕЙ МАЛАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ИЗ ЛИСТЬЕВ КУКУРУЗЫ

© 2021 г. А. Т. Епринцев¹, *, М. О. Гатауллина¹

¹Воронежский государственный университет, Воронеж, 394006 Россия

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

Поступила в редакцию 27.01.2020 г.

После доработки 15.05.2020 г.

Принята к публикации 02.09.2020 г.

В мезофилле листьев кукурузы была обнаружена одна изоформа НАДФ⁺-зависимой декарбоксилирующей малатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.40). Очистка фермента осуществлялась в четыре этапа и включала в себя гомогенизацию, фракционирование сульфатом аммония, гель-фильтрацию на сефадексе G-25 и ионообменную хроматографию на ДЭАЭ-Sephacel. Удельная активность очищенного электрофоретически гомогенного препарата составляла 92 Е/мг белка, выход – 15%, а степень очистки – 109. Относительная электрофоретическая подвижность декарбоксилирующей малатдегидрогеназы – 0.1, оптимум рН при катализе прямой и обратной реакций – 8.0. Определены значения констант Михаэлиса для прямой и обратной реакции, которые составили по малату – 5.5 мМ и пирувату – 1.3 мМ. При этом сродство к коферментам значительно различалось. Так, K_m по НАДФ⁺ равнялась 4.5 мМ, а по НАДФН – 0.9 мМ.

Ключевые слова: НАДФ⁺-зависимая декарбоксилирующая малатдегидрогеназа, *Zea mays*, очистка, константа Михаэлиса, субъединица, кинетика

DOI: 10.31857/S0555109921010232

Декарбоксилирующая малатдегидрогеназа – малик-энзим (НАДФ⁺-МЭ, КФ 1.1.1.40), является одним из важнейших ферментов, метаболизирующих малат, который важен для стабилизации величины цитоплазматического рН, контроля апертуры устьиц и повышения устойчивости к избытку алюминия и патогенам [1–3]. Другой продукт реакции НАДФ⁺-МЭ – пируват, участвует в синтезе таких защитных соединений, как флавоноиды и лигнин, которые определяют устойчивость к таким стрессам, как механическое повреждение и проникновение патогенов. Фермент обеспечивает также необходимым восстановительным коферментом НАДФН при биосинтезе флавоноидов и лигнина [4]. НАДФН имеет решающее значение для таких систем метаболизма активных форм кислорода (АФК), как путь аскорбат-глутатиона и НАДФ⁺-зависимой тиоредоксинредуктазы, он также необходим для процессов окисления при защите от микроорганизмов [5].

НАДФ⁺-МЭ экспрессируется небольшим количеством генов. Так, например, для кукурузы и гороха был описан всего один ген НАДФ-МЭ. По данным базы данных NCBI для арабидопсиса он также кодируется всего одним геном.

У млекопитающих были идентифицированы три изоформы: цитозольный НАДФ⁺-МЭ, митохондриальный НАДФ⁺-МЭ и митохондриальный НАД(Ф)⁺-МЭ, который имеет двойную специфичность, проявляющуюся при использовании в качестве кофермента НАД⁺ и НАДФ⁺, однако при нормальных условиях этот фермент предпочитает использовать кофермент НАД⁺ [6].

Цель работы – получение гомогенного препарата НАДФ⁺-МЭ и изучение его кинетических и регуляторных свойств.

МЕТОДИКА

Объектом исследования служили 10-суточные проростки кукурузы (*Zea mays* L., сорт Воронежская 76), выращенные гидропонным способом при 25°C. Для выделения мезофильной ткани листья кукурузы (2 г) гомогенизировали в 10 мл 0.1 М трис-НСl буфера, рН 6.5, содержащего 0.01 М MnCl₂, 0.04 М ДТТ и 0.04 М ЭДТА. Гомогенат фильтровали через 4 слоя марли и центрифугировали при 3000 g в течение 5 мин. Полученный супернатант представлял собой мезофилл [7].

Активность МЭ в прямой и обратной реакции определяли спектрофотометрически на СФ-2000

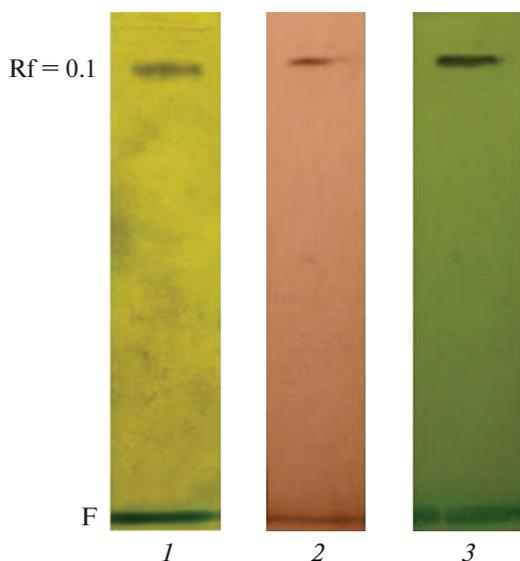


Рис. 1. Электрофорез в ПААГ НАДФ⁺-МЭ из гомогената мезофилла листьев кукурузы (1), очищенного препарата НАДФ-МЭ, окрашенного нитратом серебра (2) и очищенного препарата НАДФ-МЭ, окрашенного тетразолиевым методом (3).

(“Ломо”, Россия) по изменению оптической плотности реакционной смеси при 340 нм, свидетельствующей о скорости образования или расходования НАДФН [8, 9]. Определение скорости восстановления пирувата осуществляли в среде, содержащей 100 мМ трис-НСI буфер, рН 6.5, 1.5 мМ пируват и 0.15 мМ НАДФН. Измерение активности фермента в прямой реакции проводили в реакционной среде следующего состава: 100 мМ трис-НСI буфер, рН 6.5, 4 мМ малат и 1 мМ НАДФ⁺. В качестве кофермента использовали 5 мМ MnCl₂. За единицу ферментативной активности НАДФ⁺-МЭ принимали количество фермента, которое превращало (для обратной реакции) или образовывало (для прямой реакции) 1 мкМ НАДФН за 1 мин при 25°C.

Влияние оксиредуцирующих дегидрогеназ уменьшали понижением рН среды выделения и определения активности фермента (рН 6.5) и использования MnCl₂.

Очистка изоформ фермента на первом этапе включала осаждение белковой фракции супернатанта (мезофилла) сульфатом аммония от 35 до 85% насыщения. Полученный осадок растворяли в 100 мМ трис-НСI буфера, рН 6.5, и для освобождения от низкомолекулярных примесей наносили на колонку (1.5 × 20 см) с сефадексом G-25 (“Pharmacia”, Швеция), уравновешенную тем же буфером. Собранные фракции (1.5 мл), содержащие фермент, наносили на колонку (1.5 × 12 см) с ДЭАЭ-Sephacel (“GE Healthcare”, Швеция), уравновешенную 100 мМ трис-НСI буфером, рН 6.5. Элюцию связавшихся с сорбентом белков проводили линейным градиентом NaCl от 50 до 150 мМ в том же буфере [10, 11].

Электрофорез в 7%-ном полиакриламидном геле (ПААГ) проводили по методу, описанному в работах [12, 13]. На дорожку наносили не более 120 мкг белка.

Специфическое проявление активности малатдегидрогеназы на геле осуществляли тетразолиевым методом [14, 15]. Гели инкубировали в 15 мл 0.1 М трис-НСI-буфера, рН 6.5, содержащем 0.2 мл 2 М малата натрия, 18 мМ НАДФ⁺, 10 мМ нитросинего тетразолия, предварительно растворенного в 0.5 мл этиленгликоля, и 0.6 мМ феназин-метасульфата (ФМС). Локализацию фермента устанавливали по накоплению диформазана.

Гели, на которые наносили 5–7 мкг белка, были также окрашены нитратом серебра [16–18].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При проведении электрофореза в ПААГ в мезофилле листьев кукурузы была обнаружена только одна изоформа НАДФ⁺-МЭ с относительной электрофоретической подвижностью 0.1 (рис. 1). Активность данного фермента определялась в цитоплазматической фракции мезофилла листьев кукурузы и составляла 98–99% от его общей активности в клетке. Это указывало на субклеточную локализацию НАДФ⁺-МЭ в цитоплазме.

Для получения высокоочищенных препаратов НАДФ⁺-МЭ использовали многостадийную схему очистки, результаты которой представлены в табл. 1. При осаждении сульфатом аммония на-

Таблица 1. Очистка НАДФ⁺-зависимого малик-энзима ($n = 4$; $p \leq 0.05$).

Стадии очистки	Общий объем, мл	Общая активность, Е	Белок, мг	Удельная активность, Е/мг белка	Степень очистки	Выход, %
Гомогенат	17	39.1	46.5	0.8	1	100
Фракционирование сульфатом аммония	2	17.6	5.5	3.2	3.8	44
Гель-фильтрация на сефадексе G-25	6	14.5	5.3	2.7	3.2	37
Ионообменная хроматография на ДЭАЭ-Sephacel	4	5.8	0.063	92	109	15

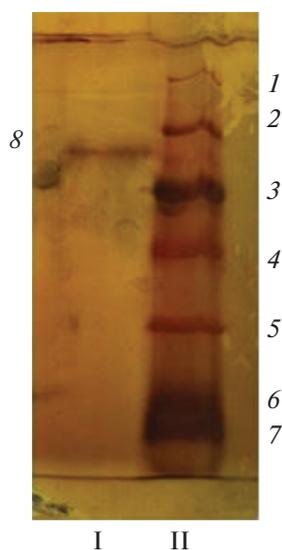


Рис. 2. Электрофорез в ПААГ в присутствии ДДС-Na НАДФ-МЭ (I) из мезофила листьев кукурузы (8) и белки-маркеры (II) молекулярной массы: β -галактозидаза – 116 кДа (1), БСА – 66.2 кДа (2), овалбумин – 45 кДа (3), лактатдегидрогеназа – 35 кДа (4), рестриктаза Bsp981 – 25 кДа (5), β -лактоглобулин – 8.4 кДа (6), лизоцим – 14.4 кДа (7).

блюдалось 8-кратное уменьшение содержания общего белка и значительное ингибирование активности фермента. Однако его удельная активность увеличилась до 3.2 Е/мг белка. При обессоливании на сефадексе G-25 удалялись низкомолекулярные примеси, а также сульфат аммония, оказывающий ингибирующее действие на активность фермента. Ионообменная хроматография на ДЭАЭ-Sephacel, используемая на 4 стадии очистки, позволила отделить примеси других белков. Фермент, выделенный с выходом 15% и

степенью очистки 109, имел удельную активность 93 Е/мг белка (табл. 1).

Электрофоретический анализ полученного препарата НАДФ⁺-МЭ после проявления нитратом серебра показал присутствие только одного белкового компонента с $R_f = 0.1$, что свидетельствовало о его гомогенности (рис. 1). После специфического проявления активности НАДФ⁺-МЭ тетразолиевым методом было установлено, что этот белковый компонент обладал малатдегидрогеназной активностью (декарбоксилирующей).

Для изучения четвертичной структуры белковой молекулы исследуемого фермента использовали метод электрофореза в присутствии денатурирующего агента додецилсульфата натрия (ДДС-Na), который позволял выявить присутствие субъединиц белка [19]. Результаты электрофореза в денатурирующих условиях приведены на рис. 2. Молекулярная масса субъединицы равнялась 54 ± 3.2 кДа, молекулярная масса нативной молекулы НАДФ⁺-МЭ была определена методом гель-хроматографии на сефадексе G-200 и составила 225 ± 8.4 кДа. Таким образом, можно заключить, что исследуемый фермент (НАДФ⁺-МЭ) состоял из четырех одинаковых субъединиц, то есть являлся гомотетрамером.

Были изучены каталитические свойства гомогенной НАДФ⁺-МЭ. Известно, что концентрация субстрата и его сродство с ферментом определяет скорость ферментативной реакции. Исследование процесса восстановления малата высокоочищенной НАДФ⁺-МЭ позволило доказать, что ферментативная реакция подчиняется закону Михаэлиса-Ментен [14]. Величины констант Михаэлиса для НАДФ⁺-МЭ, представленные на графиках, составили по малату – 5.5 мМ, НАДФ⁺ – 4.5 мМ, пирувату – 1.3 мМ и НАДФН – 0.9 мМ (рис. 3 и 4).

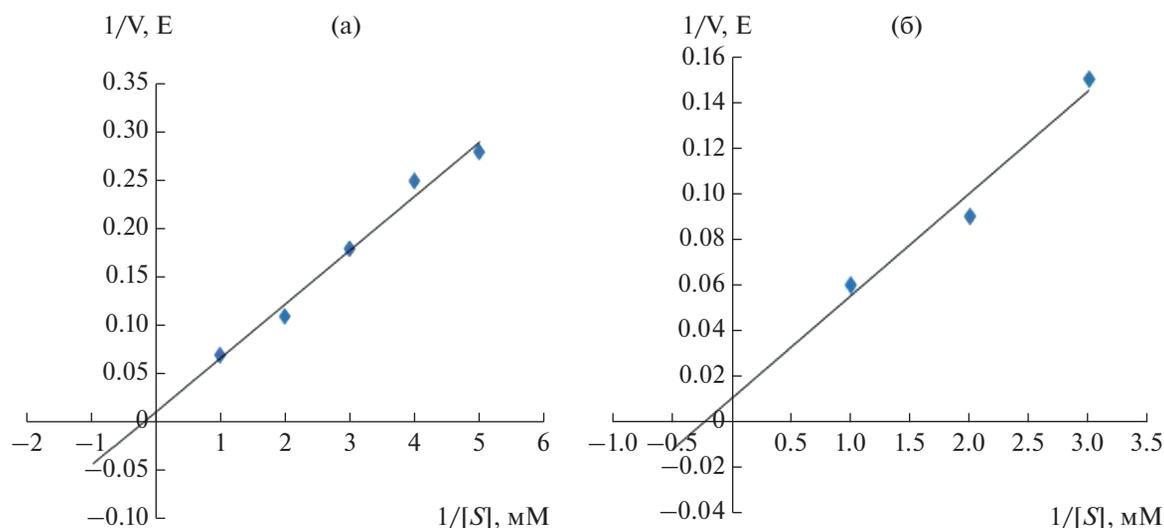


Рис. 3. Определение значения K_M для НАДФ-МЭ в прямой реакции по малату (а) и с НАДФ⁺ (б).

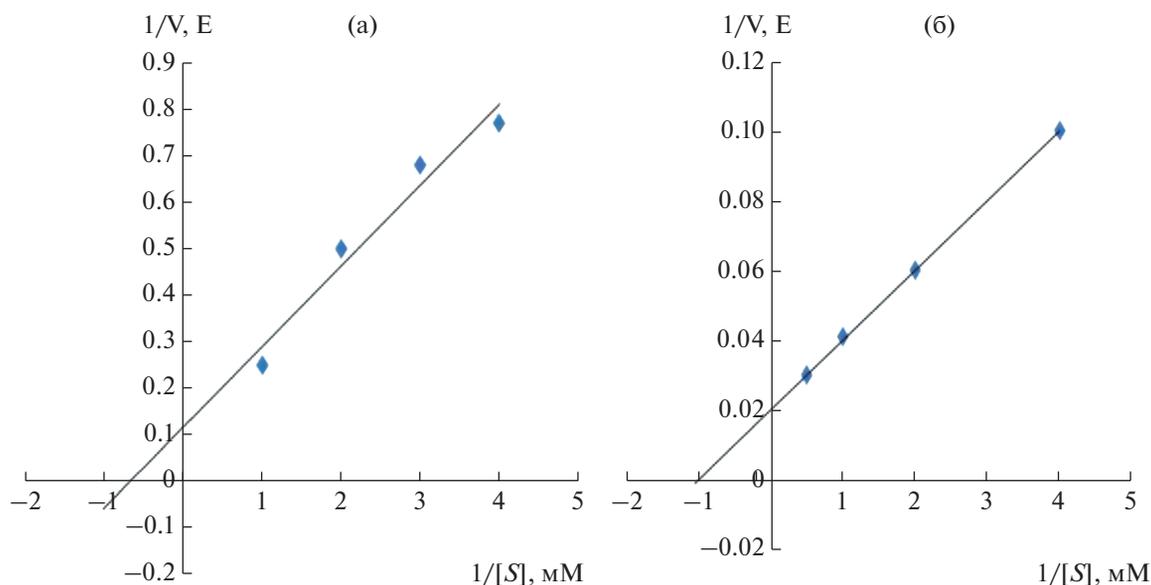


Рис. 4. Определение значения K_M для НАДФ-МЭ в обратной реакции по пирувату (а) и НАДФН (б).

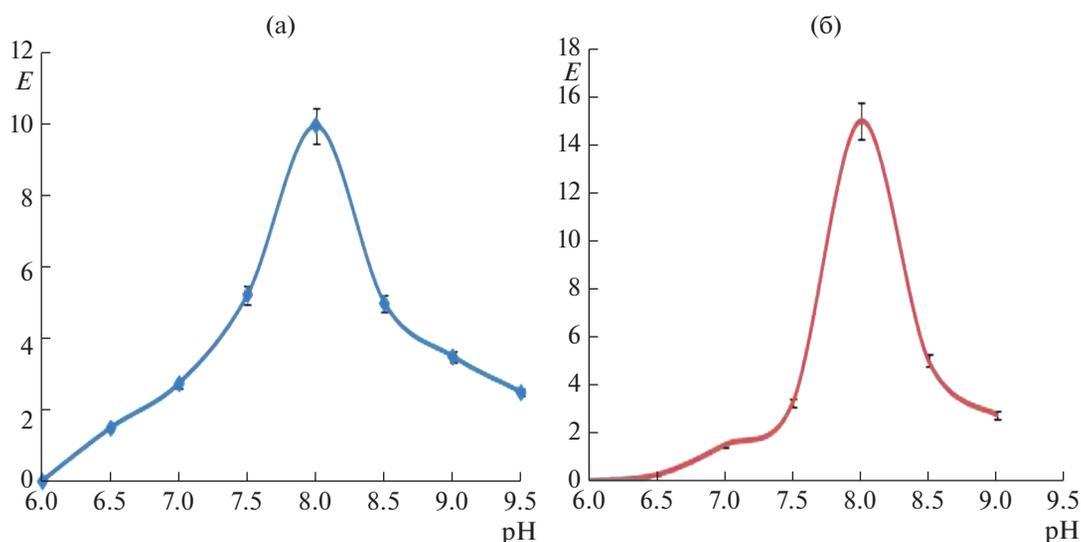


Рис. 5. Зависимость активности НАДФ-МЭ от pH среды в прямой (а) и обратной (б) реакции.

Изучение влияния pH среды на активность НАДФ⁺-МЭ показало, что оптимум действия фермента в прямой и обратной реакции – pH 8.0 (рис. 5). Следует отметить, что другие формы оксидоредуцирующих малатдегидрогеназ из хлоропластов, пероксисом, митохондрий и цитоплазмы характеризовались оптимальными значениями pH для прямой реакции 9.5, а обратной – 9.0 [20].

Таким образом, использование многостадийной схемы очистки позволило получить электрофоретически гомогенные препараты цитоплазматической декарбоксилирующей малатдегидрогеназы из мезофилла листьев кукурузы. Были исследованы ее

физико-химические и каталитические характеристики. Установлено, что фермент представлял собой гомотетрамер, состоящий из четырех одинаковых субъединиц. Обнаружено, что фермент проявлял максимальное сродство по отношению к пирувиноградной кислоте. Различные кинетические и каталитические характеристики НАДФ⁺-МЭ из мезофилла листьев кукурузы свидетельствовали об его участии в катализе различных метаболических процессов.

Исследования выполнены при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-14-00150).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Alfonso S.U., Brüggemann W* // Photosynth. Res. 2012. V. 112. № 3. P. 175–191.
2. *Vorapreeda T., Thammarongtham C., Cheevadhanarak S., Laoteng K* // Microbiology. 2013. V. 159. № 12. P. 2548–2557.
3. *Chang G.G., Tong L.* // Biochemistry. 2003. V. 42. № 44. P. 12721–12733.
4. *Voll L.M., Zell M.B., Engelsdorf T., Saur A., Gerrard Wheeler M.C., Drincovich M.F., Maurino V.G* // New Phytologist. 2012. V. 195. № 1. P. 189–202.
5. *Maier A., Zell M.B., Maurino V.G.* // J. Exp. Bot. 2011. V. 62. № 9. P. 3061–3069.
6. *The National Center for Biotechnology Information.* <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
7. *Popov V.N., Eprintsev A.T., Igamberdiev A.U.* // J. Plant Physiol. 2003. V. 160. № 8. P. 851–857.
8. *Eprintsev A.T., Fedorin D.N., Karabutova L.A., Igamberdiev A.U.* // J. plant physiology. 2016. V. 205. P. 33–40.
9. *Eprintsev A.T., Fedorin D.N., Dobychina M.A., Igamberdiev A.U.* // Plant Science. 2018. V. 272. P. 157–163.
10. *Епринцев А.Т., Попов В.Н.* Ферментативная регуляция метаболизма ди- и трикарбонновых кислот в растениях. Воронеж: Изд-во Воронежского ун-та, 1999. 192 с.
11. *Igamberdiev A.U., Eprintsev A.T.* // Front. Plant Sci. 2016. V. 7. P. 1042. <https://dx.doi.org/10.3389%2Ffpls.2016.01042>
12. *Davis B.J., Ornstein L.* A New High Resolution Electrophoresis method. N. Y.: Society for the Study at the New York Academy of Medicine, 1959. P. 112–118.
13. *Мауэр Г.* Диск-электрофорез. М.: Мир, 1971. 222 с.
14. *Гааль Э., Медьешу Г., Верецкеи Л.* Электрофорез в разделении биологических макромолекул / Ред. В.И. Розенгарт М.: Мир, 1982. 446 с.
15. *Fieldes M.A.* // Electrophoresis. 1992. V. 13. № 1–2. P. 82–86.
16. *Nesterenko M.V., Tilley M., Upton S.J.* // J. Biochem. Biol. 1994. V. 28. № 3. P. 239–242.
17. *Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., Mann M.* // Anal. Chem. 1996. V. 68. № 5. P. 850–858.
18. *Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.* // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. № 1. P. 265–275.
19. *Eprintsev A.T., Fedorin D.N., Cherkasskikh M.V., Igamberdiev A.U.* // J. Plant Physiol. 2018. V. 221. P. 81–84.
20. *Епринцев А.Т., Гатаулина М.О.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2018. Т. 54. № 3. С. 299–303.

Kinetic Properties of NADP⁺-Dependent Decarboxylating Malate Dehydrogenase from Corn Leaves

A. T. Eprintsev^{a,*} and M. O. Gataullina^a

^aVoronezh State University, Voronezh, 394006 Russia

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

One isoform of NADP⁺-dependent decarboxylating malate dehydrogenase (EC 1.1.1.40) was found in the leaf mesophyll of corn. The enzyme was purified in four stages and included homogenization, fractionation with ammonium sulfate, gel filtration on Sephadex G-25, and ion exchange – Sephacel. The specific activity of the purified electrophoretically homogeneous preparation was 92 E/mg of protein, while its yield was 15%, and the degree of purification was 109 times. The relative electrophoretic mobility of decarboxylating malate dehydrogenase was 0.1. The optimum pH for the enzyme to function during catalysis of the forward and reverse reactions was 8.0. The K_m were determined for the direct and reverse reactions, which were 5.5 mM for malate and 1.3 mM for pyruvate. Moreover, the affinity for coenzymes varied significantly. So, K_m for NADP⁺ was equal to 4.5 mM, and K_m for NADPH – 0.9 mM.

Keywords: NADP⁺-dependent decarboxylating malate dehydrogenase, *Zea mays*, purification of enzyme, Michaelis constant, subunit, kinetics