



УДК 547.476.2/621.039.85:577.152.1

ДВА СПОСОБА ФЕРМЕНТАТИВНОГО 4-¹⁴C-МЕЧЕНИЯ L-МАЛАТА

© 1997 г. В. В. Павловец, А. К. Романова

Институт почвоведения и фотосинтеза РАН, 142292, г. Пущино Московской обл.

Поступила в редакцию 10.07.96 г. Принята к печати 10.12.96 г.

L-Малат, меченный в положении 4, находит широкое применение при исследовании кинетических свойств ферментных систем и надмолекулярных комплексов, содержащих малатдегидрогеназы, а также может быть использован в синтезе 4-C-меченой L-аспарагиновой кислоты. L-[4-¹⁴C]малат синтезирован в сопряженных ферментных реакциях двух типов, содержащих фосфоенолпируват-карбоксилазу из листьев кукурузы или NAD⁺-“малик”-фермент из листьев *Amaranthus retroflexus*, и очищен с применением методов ионообменной хроматографии или хроматографии на бумаге. Полученный препарат (чистота более 97%) обладает удельной радиоактивностью 1.7 Ки/моль.

Ключевые слова: 4-C-меченый L-малат, синтез, сопряженные ферментные реакции.

Ферментативные способы получения меченых изотопами метаболитов широко распространены в исследовательской практике главным образом из-за высокой стереоспецифичности реакций и возможности их осуществления в водных растворах.

L-Малат, меченный по углероду в положении 4, незаменим при исследовании кинетических свойств ферментных систем, включая надмолекулярные комплексы, содержащие малатдегидрогеназы (циклы Кребса и Хэтча–Слэка, малат-аспаратное переаминирование при фотосинтезе и др. [1, 2]). Мы используем L-[4-¹⁴C]малат (I) при определении активности мультферментного комплекса из листьев кукурузы, содержащего NADP⁺-“малик”-фермент (L-малат:NADP⁺-оксидоредуктаза (декарбоксилирующая оксалоацетат, КФ 1.1.1.40); рибулозобисфосфаткарбоксилазу (3-фосфо-D-глицераткарбокси-лиаза (димеризующая), КФ 4.1.1.39); рибулозфосфат-изомеразу (D-рибулозо-5-фосфат-кетолизомеразу, КФ 5.3.1.6) и фосфорибулокиназу (фосфопентокиназа, КФ 2.7.1.19) [2]. Этот комплекс осуществляет перенос ¹⁴C-меченого фрагмента соединения (I) на 3-фосфо[1-¹⁴C]глицериновую кислоту в присутствии NADP⁺, АТФ и рибулозо-5-фосфата [2]. Исследование кинетических характеристик суммарного каталитического процесса (активность комплекса) позволяет определить вклад каждого из ферментов в изменение активности комплекса в ответ на изменение концентрации эффектора (эластичность данной ферментной системы) [3, 4].

Сокращения: PEP – фосфоенолпируват, MDH – малатдегидрогеназа, LDH – лактатдегидрогеназа, ME – NAD⁺-“малик”-фермент, ADH – алкогольдегидрогеназа, HEPES – N-(2-гидроксиэтил)пиперазин-N'-(2-этансульфоновая кислота).

Не менее перспективным представляется использование L-[4-¹³C]малата в качестве предшественника при ферментативном или химическом синтезе L-[4-¹³C]аспарагиновой кислоты и L-аспарагина. Эти и другие аминокислоты, избирательно меченные стабильными изотопами (¹³C и ¹⁵N), используются как в клинических исследованиях для определения содержания метки в газообразных продуктах метаболизма методом ИК-спектроскопии Фурье [5, 6], так и при изучении квазикристаллической пространственной структуры полипептидов и низкомолекулярных белков с помощью техники многомерной ЯМР-спектроскопии [7, 8].

Единственный пример ферментативного синтеза соединения (I) с помощью препарата, выделенного из листьев кукурузы и содержащего фосфоенолпируват-карбоксилазную (КФ 4.1.1.31) и малатдегидрогеназную (КФ 1.1.1.82) активности, приведен в работе [9] (схема 1). Выход продукта (I) составил 95% (в расчете на фосфоенолпируват), производительность системы – 0.25 мкмоль продукта/мл реакционной смеси.



Схема 1.

Мы усовершенствовали схему 1 введением дополнительного цикла регенерации кофактора NADH с помощью алкогольдегидрогеназы (КФ 1.1.1.1) (схема 2). Этим способом было получено 14,6 мкмоль продукта (I) с 1 мл реакционной смеси, выход 97% в расчете на внесенные ^{14}C -бикарбонат и фосфоенолпируват.

Другая используемая нами схема синтеза малата (I) (схема 3) включает в себя последовательные сопряженные реакции: окисление лактата до пирувата и восстановление NAD⁺ за счет активности лактатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.27) и последующее карбоксилирование образовавшегося пирувата, сопряженное с окислением NADH с помощью NAD⁺-“малик”-фермента (малатдегидрогеназа (декарбоксилирующая), КФ 1.1.1.39, далее – “малик”-фермент). Лактатдегидрогеназа генерирует один из субстратов и регенерирует кофактор для “малик”-фермента, который, в свою очередь, регенерирует кофактор для первой реакции.

По схеме 3 получено 90% фиксирование [^{14}C]бикарбоната, введенного в реакцию. При этом концентрация продукта (I) составляла около 13 мкмоль/мл реакционной среды. Удельная радиоактивность препарата (I) в наших экспериментах была не менее 1,7 мКи/ммоль.

Очистку малата (I) проводили либо ионообменной хроматографией по методике, аналогичной опубликованной ранее [10], либо хроматографией на бумаге. В обоих случаях полученный препарат на 97% состоял из соединения (I).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Использовали малат Na, фосфоенолпируват Na, дитиотреит, NAD⁺, NADH, малатдегидрогеназу (КФ 1.1.1.37) (Reanal, Венгрия); лактат натрия марки ч. (“Реахим”, Россия), NaH¹⁴CO₃ (2,0 мКи/ммоль) (“Изотоп”, Россия); дауэкс 1 × 8, HEPES, EDTA, 2-меркаптоэтанол (Serva, Германия), фенилметилсульфонилфторид (Sigma, США). Остальные реактивы отечественного производства марки х. ч.

В реакциях синтеза использовали дегазированные растворы, ферментные препараты вносили в минимальном объеме.

Активность “малик”-фермента, фумаразы, PEP-карбоксилазы и лактатдегидрогеназы определяли спектрофотометрическим методом согласно методикам [11–14] на двулучевом спектрофотометре Shimadzu UV-160 (Япония) при 25°C. За единицу активности (ед. акт.) принимали количество фермента, катализирующее появление 1 мкмоль продукта реакции в 1 мин.

Выделение ферментных препаратов проводили при 4–6°C. Значения pH буферов даны при 25°C. Препарат лактатдегидрогеназы (20000 ед. акт./мл) выделяли из мышц кролика по методике [14]

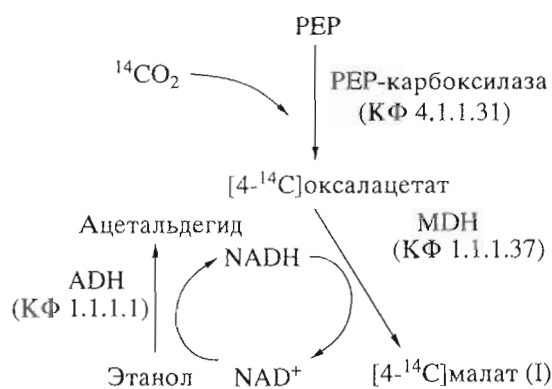


Схема 2.

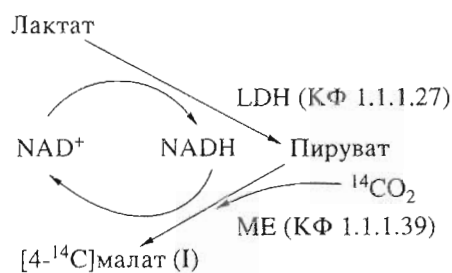


Схема 3.

(с. 70–78). Сопутствующая активность фумаразы составляла менее 0,1% активности лактатдегидрогеназы.

Для выделения ферментного препарата NAD⁺-“малик”-фермента молодые листья *A. retroflexus* гомогенизировали в 5-кратном объеме буфера (pH 7,5), содержащего 50 мМ 2-меркаптоэтанол, 1 мМ EDTA, 0,1 мМ фенилметилсульфонилфторид и 100 мМ HEPES-NaOH. Смесь центрифугировали (40 мин, 18000g), фракционировали сульфатом аммония в пределах 40–60% насыщения, диализовали против 50 мМ HEPES-NaOH-буфера (pH 7,5), содержащего 1 мМ дитиотреит, 0,1 мМ EDTA, 5 мМ MgCl₂, и хранили в присутствии 20% глицерина (v/v) при –20°C. Активность “малик”-фермента в полученном препарате составляла 800 ед. акт./мл.

Препарат PEP-карбоксилазы с уд. акт. 20 ед. акт./мг получали по методике [13].

Синтез *L*-малата (I) по схеме 3 проводили в 1,5 мл пластиковых пробирках при 30°C. Реакционная смесь содержала 50 мМ HEPES-NaOH, 100 мМ лактат Na, 5 мМ MgCl₂, 15 мМ NaH¹⁴CO₃ (2,0 Ки/моль), 1 мМ дитиотреит, 10% глицерин, ферментные препараты NAD⁺-“малик”-фермента и лактатдегидрогеназы (соответственно 10 и 300 ед. акт.), pH 7,5. Реакцию инициировали добавлением NAD⁺ до концентрации 10 мМ.

Синтез малата (I) по схеме 2 проводили в тех же условиях, что и по схеме 3, со следующими изменениями: вместо лактата Na, NAD⁺ и ферментных препаратов "малик"-фермента и лактатдегидрогеназы использовали PEP (15 мМ) и этанол (25 мМ), PEP-карбоксилазу (2 ед. акт.), малатдегидрогеназу (КФ 1.1.1.37; 20 ед. акт.) и алкогольдегидрогеназу (5 ед. акт.). Реакцию инициировали добавлением NADH до 0.5 мМ. За ходом синтеза следили по накоплению малата в реакционной смеси.

Количество малата в образцах принимали равным количеству образовавшегося NADH в реакционной смеси, содержащей 50 мМ HEPES-NaOH (рН 7.5), 1 мМ 2-меркаптоэтанол, 5 мМ NAD⁺ и 1 ед. акт. малатдегидрогеназы, за 15 мин инкубации. В контрольных экспериментах было показано, что этого времени достаточно для превращения 95% малата, если его концентрация в реакционной смеси не превышала 1 мМ.

Очистка малата. Реакцию синтеза малата останавливали прогреванием пробирок в термостате при 90°C в течение 10 мин. Белок отделяли центрифугированием (10 мин, 10000g), супернатант хроматографировали двумя способами: 1) на бумаге в системе растворителей этанол-аммиак (25%)—вода (80 : 4 : 16), малат (I) (R_f 0.45) элюировали водой, упаривали и лиофилизировали; 2) на колонке (0.5 × 2.0 см) с анионообменником дауэкс 1 × 8, уравновешенным 5 мМ муравьиной кислотой. Лактат и пируват элюировали 10 мМ боратом Na (рН 8.5), как описано в работе [10]. Малат элюировали в линейном градиенте (10–600 мМ) муравьиной кислоты, упаривали в вакууме и сушили лиофильно. Чистоту полученного препара-

та определяли энзиматически с помощью малатдегидрогеназы, как было описано выше.

Автор благодарен проф. А.А. Москаленко за критическое обсуждение результатов работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Эдвардс Дж., Уокер Д. Фотосинтез C₃ и C₄ растений: механизмы и регуляция. М.: Мир, 1986. 600 с.
2. Павловец В.В., Прусакова О.В., Ломонова Н.А., Романова А.К. // Докл. РАН. В печати.
3. Kellershohn N., Ricard J. // Eur. J. Biochem. 1994. V. 220. P. 955–961.
4. Giersch Chr. // J. Theor. Biol. 1994. V. 169. P. 89–99.
5. Irving C.C., Klein P.D., Navratil P.R., Boulton T.W. // Anal. Chem. 1986. V. 58. P. 2172–2178.
6. Lee E.S., Majkowski R.F., Partin D.L. US Patent. 1987. N4684805.
7. Oh B.H., Westler W.M., Darba P., Markley J.L. // Science. 1988. V. 240. P. 908–911.
8. Пшеничникова А.Б., Карнаухова Е.Н., Звонкова Е.Н., Швец В.И. // Биоорг. химия. 1995. Т. 21. С. 163–178.
9. Hatch M.D. // Anal. Biochem. 1972. V. 47. P. 174–183.
10. Swezey R.R. // J. Chromatogr. Ser. B. 1995. V. 669. P. 171–176.
11. Neubert D., Coper H. // Biochem. Z. 1965. V. 341. P. 485–487.
12. Racher E. // Biochim. Biophys. Acta. 1950. V. 4. P. 211–213.
13. Jiao J.-A., Chollet R. // Arch. Biochem. Biophys. 1988. V. 261. P. 409–417.
14. Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии. М.: Высш. шк., 1980. С. 71.

Two Methods for Enzymic 4-¹⁴C-Labeling of L-Malate

V. V. Pavlovets and A. K. Romanova

Institute of Soil Sciences and Photosynthesis, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast, 142292 Russia

Abstract—4-C-Labeled malate, which is widely used for studying the kinetic properties of enzymic systems and supramolecular complexes containing malate dehydrogenase, may be used for the synthesis of 4-C-labeled L-aspartic acid. L-[4-¹⁴C]Malate was synthesized in coupled enzymic reactions of two types using maize leaf phospho(enol)pyruvate carboxylase and NAD⁺-malic enzyme from *Amaranthus retroflexus* leaves and purified by ion-exchange or paper chromatography. The synthesized [4-¹⁴C]malate (97% purity) displayed a specific radioactivity of 1.7 Ci/mol.

Key words: 4-C-labeled L-malate, synthesis, coupled enzymic reactions.