



УДК 577.158.036

**ИЗУЧЕНИЕ МЕТОДОМ АНАЛИТИЧЕСКОГО ИЗОТАХОФЕРЕЗА
ИЗМЕНЕНИЙ СТРУКТУРЫ ФОРМИАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ
ПРИ ЕЕ ИНАКТИВАЦИИ***Диков М. М., Карулин А. Ю., Осипов А. П.,
Егоров А. М.**Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
химический факультет*

Методом аналитического изотахофереза изучены процессы инактивации форматдегидрогеназы при 37 и 60° С. Показано, что инактивация фермента, обусловленная окислением SH-групп кислородом воздуха, при 37° С сопровождается незначительными изменениями в структуре молекулы, в то время как при 60° С термоинактивация приводит к сильным нарушениям структуры и появлению большого числа неактивных форм, различающихся по изотахоферетической подвижности.

Исследование механизмов инактивации ферментов имеет чрезвычайно важное значение в практическом и теоретическом аспектах. Выяснение причин, обуславливающих инактивацию, а также процессов, происходящих при этом, позволит наметить эффективные пути повышения стабильности ферментов. С другой стороны, знание механизмов инактивации даст возможность подойти к решению одной из основных задач биохимии — выяснению соотношения структуры и функции ферментов.

В настоящей работе для изучения процесса инактивации форматдегидрогеназы (КФ 1.2.1.2) из грамотрицательных метилотрофных бактерий, штамм № 1 [1], в сочетании с кинетическими методами был использован метод аналитического изотахофереза. К настоящему времени аналитический изотахоферез с успехом применен для исследования состава неорганических, органических, а также биологических смесей [2—6]. Метод основан на разделении веществ по их подвижности в электрическом поле и обладает высокой чувствительностью. Изотахоферетическая подвижность является основной характеристикой веществ в данном методе и зависит от величины заряда, размеров и формы молекул. Можно ожидать поэтому, что изменения конформации и заряда функциональных групп белков, возникающие в результате различных воздействий на них, найдут отражение в изменении изотахоферетической подвижности.

Изучение температурной зависимости инактивации нативной форматдегидрогеназы показало, что при 37° С в отсутствие стабилизаторов кривая инактивации фермента имеет характерную S-образную форму, соответствующую нескольким стадиям инактивации (рис. 1, 1). Сульфгидрильные реагенты (меркаптоэтанол, дитиотреит) и этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA) оказывают в этих температурных условиях сильное стабилизирующее действие [7]. Титрованием SH-групп фермента с помощью 5,5'-дитио-бис(2-нитробензойной кислоты) (ДТНБ) в 8 М мочевины было установлено, что процесс инактивации сопровождается уменьшением общего количества SH-групп фермента (таблица). Эти данные говорят о том, что форматдегидрогеназа, как и большинство дегидроге-

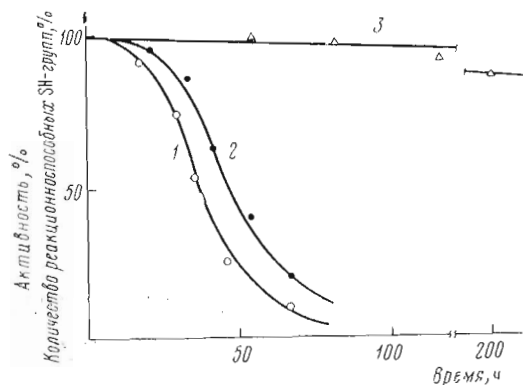


Рис. 1

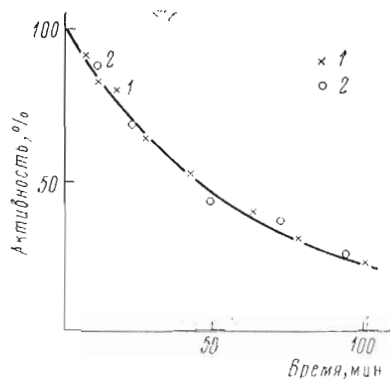


Рис. 2

Рис. 1. Кинетика инактивации при 37° С (рН 7,5) нативной формиатдегидрогеназы (1), уменьшение количества реакционноспособных SH-групп при этом (2) и инактивация фермента в присутствии 10 мкМ KN_3 и 0,2 мМ NAD^+ (3); (E) 2 мкМ

Рис. 2. Термоинактивация нативной формиатдегидрогеназы (1) и в присутствии 1 мМ EDTA (2) при 60° С (рН 7,5); [E] 1,5 мкМ

наз, относится к обширному классу ферментов, инактивация которых при средних температурах обусловлена окислением сульфгидрильных групп [8]. Роль EDTA в стабилизации фермента заключается в связывании в растворе примесей ионов тяжелых металлов, которые являются катализаторами процесса окисления сульфгидрильных групп кислородом воздуха.

Ранее было показано, что молекула формиатдегидрогеназы содержит 12 SH-групп [9]. Роль каждой из этих групп в поддержании каталитической активности и в процессе инактивации фермента различна. Две SH-группы наиболее реакционноспособны по отношению к ДТНБ и, как предполагается, участвуют в связывании кофактора (NAD^+) [7, 9]. Титрованием этих существенных SH-групп нативного фермента ДТНБ было найдено, что их количество уменьшается в процессе инактивации и это уменьшение коррелирует с падением активности (рис. 1, ср. кривые 1, 2).

Образование прочного тройного комплекса фермент — NAD^+ — азид (константа диссоциации кофактора из тройного комплекса равна $1,5 \cdot 10^{-7}$ М [10]) приводит к значительной стабилизации фермента и замедляет процесс окисления его сульфгидрильных групп. В течение 200 ч при 37° С теряется не более 15% исходной активности (рис. 1, 3), общее число SH-групп также уменьшается незначительно (таблица). На этом основании можно полагать, что специфическое связывание NAD^+ и азидов в активном центре фермента предохраняет его существенные SH-группы от окисления и стабилизирует нативную конформацию фермента, в которой

Изменение общего числа SH-групп формиатдегидрогеназы, нативной и в тройном комплексе с NAD^+ и азидом при инактивации (37° С, рН 7,5)

Время, ч	Нативный фермент	Комплекс фермент — NAD^+ — азид	Время, ч	Нативный фермент	Комплекс фермент — NAD^+ — азид
20	92	—	65	30	—
30	83	—	76	—	100
35	75	—	116	—	91
45	51	—	174	—	85
52	—	100	239	—	83

Примечание. За 100% принимали количество SH-групп, определенное перед началом инактивации, составляющее 12 групп на молекулу фермента.

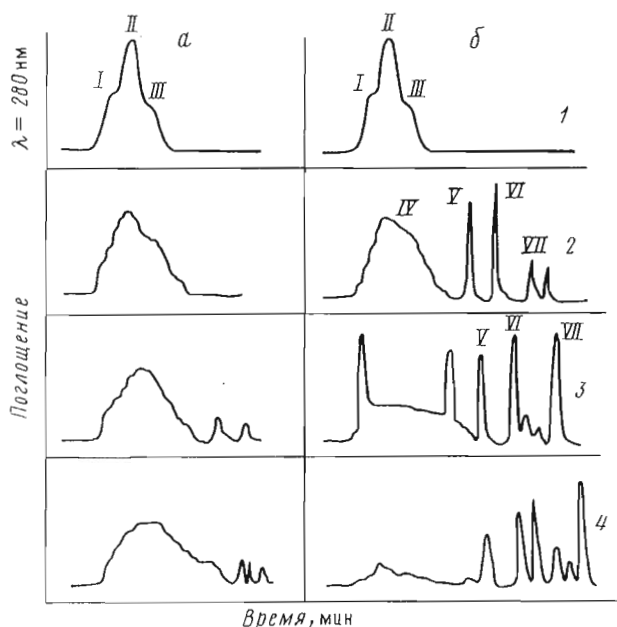


Рис. 3. Изоахроферограммы нативной форматдегидрогеназы (I) и инактивированной при 37° С (а) [образцы с остаточной активностью 95 (2), 25 (3), 0% (4)] и при 60° (б) [образцы с остаточной активностью 61 (2), 40 (3), 15% (4)]

окисление несущественных SH-групп фермента также затруднено. Эти факты указывают на то, что в процессе инактивации большую часть утраты ферментативной активности вызывает окисление именно двух реакционноспособных SH-групп. Окисление остальных SH-групп, по-видимому, не приводит к столь резкому падению активности, однако может оказывать влияние на конформацию белковой глобулы, например, за счет образования дисульфидных связей или изменения заряда.

Учитывая данные о неодинаковой роли различных SH-групп в функционировании фермента, для объяснения наблюдаемой сложной кинетики инактивации форматдегидрогеназы при 37° С можно предложить следующую схему: на первой, медленной стадии происходит в основном окисление несущественных SH-групп фермента. Этот процесс вызывает, очевидно, некоторые изменения заряда и конформации белковой молекулы. Постепенное накопление этих изменений приводит к закреплению такой конформации фермента, в которой значительно облегчается окисление двух существенных для активности SH-групп наряду с продолжающимся окислением остальных SH-групп.

При 60° С наблюдается быстрая термоинактивация фермента (рис. 2) ($k, 1,7 \cdot 10^{-2} \text{ мин}^{-1}$), которая, как известно, сопровождается сильными изменениями структуры белковой глобулы [11, 12].

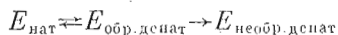
Изменения нативной конформации и общего заряда молекулы фермента, возникающие в процессе химической инактивации и термоинактивации, должны отразиться на его изоахроферетической подвижности. Поэтому аналитический изоахроферез был использован для изучения характера и интенсивности изменений структуры и заряда форматдегидрогеназы при ее инактивации.

На изоахроферограмме нативной форматдегидрогеназы (рис. 3) видны три основные формы (пики I—III). Через 20—24 ч после начала инактивации при 37° С (медленная стадия) фермент сохраняет около 90% исходной активности, однако число форм форматдегидрогеназы увеличивается до 12—14. Эти формы возникают, вероятно, в результате окисления

песущественных SH-групп и, как видно, несильно различаются по конформации и общему заряду. Можно предположить, что их появление отражает образование на начальной стадии инактивации белковых молекул с различным набором окисленных и восстановленных SH-групп. На больших глубинах инактивации границы между отдельными зонами сливаются, однако общее число зон увеличивается незначительно. Это указывает на то, что быстрая стадия инактивации, связанная с окислением SH-групп активного центра, не сопровождается сильными изменениями структурных характеристик молекулы и ее изотахофретической подвижности.

Процесс инактивации при 60°С связан с иными изменениями структуры белка. В этом случае можно выделить два качественно различных этапа изменения изотахофретической подвижности. На начальной стадии инактивации наблюдается появление большого количества форм белка, мало отличающихся по подвижности от нативного фермента (рис. 3 б-2, пик IV). Вместе с этим образуются формы белка, резко различающиеся по своей изотахофретической подвижности (рис. 3 б-2, пики V-VII). С увеличением степени инактивации наблюдается уменьшение и полное исчезновение нативной формы фермента и образование большого числа новых форм денатурированного белка.

Согласно современным представлениям о механизме тепловой денатурации белков [11, 12], существуют две стадии денатурации — обратимая и необратимая, различающиеся по степени изменения нативной структуры белка:



Можно предположить, что формы, имеющие подвижность, близкую к подвижности нативного фермента, представляют собой обратимо инактивированный фермент, конформации которого не очень сильно отличаются от конформации нативной формиатдегидрогеназы. В дальнейшем происходит необратимый переход в молекуле белка, связанный с глубокими изменениями структуры белковой глобулы, приводящей к сильному изменению изотахофретической подвижности.

Отметим, что инактивация фермента при 60°С не обусловлена окислением его SH-групп, так как кинетика инактивации не меняется в присутствии EDTA (рис. 2).

Различия в изотахофреграммах, полученных для формиатдегидрогеназы, инактивированной при 37 и 60°С, подтверждают вывод, сделанный на основании кинетических исследований, что механизм инактивации при 37 и 60°С различен. При средних температурах инактивация обусловлена окислением активных SH-групп и сопровождается малыми изменениями конформации и заряда молекулы, в то время как при высоких температурах преобладает процесс, приводящий к сильным изменениям в структуре белковой глобулы, не связанным с окислением сульфгидрильных групп.

Полученные результаты позволяют считать, что аналитический изотахофрез может быть ценным методом для исследования изменений структуры и заряда белков при различных воздействиях на них.

Экспериментальная часть

Формиатдегидрогеназа была выделена из штамма № 1 грамотрицательных метилотрофных бактерий согласно методике [1] в присутствии EDTA. Выделенный препарат фермента обрабатывали меркаптоэтанолом [1]. Величина удельной активности после отделения меркаптоэтанолом гель-фильтрацией через сефадекс G-50 составила 8,4 мкмоль/мин·мг. Полученный препарат был гомогенен согласно данным скоростной седиментации и аналитического изотахофреза. Активность фермента определяли в анализаторе скоростей ферментативных реакций «Reaction Rate Analyzer

8600» (ЛКВ, Швеция) в 0,05 М фосфатном буфере, рН 7,0, при 37° С и концентрациях NAD^+ 1,3 мМ и формиата 0,3 М [10].

Инактивацию формиатдегидрогеназы проводили при 37 и 60° С в 0,05 М фосфатном буфере, рН 7,5. Концентрация фермента в растворе при инкубации не превышала 2 мкМ.

Титрование SH-групп фермента проводили в 0,05 М фосфатном буфере, рН 7,8, добавляя 100 мкл раствора 10 мМ ДТНБ к 2 мл раствора формиатдегидрогеназы с концентрацией 1,8 мкМ. За протеканием реакции следили спектрофотометрически по увеличению поглощения при 412 нм, принимая коэффициент мольного поглощения тионитрофенолят-иона равным $13\,600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ [13]. Количество реакционноспособных групп рассчитывали по величине поглощения для времени 10—15 мин (первое плато на кривой титрования). Общее число сульфгидрильных групп определяли аналогично в растворе, содержащем 8 М мочевины, отбирая из инкубируемых растворов аликвоты по 250 мкл. Количество SH-групп рассчитывали по выделению тионитрофенолят-иона. Коэффициент мольного поглощения тионитрофенолят-иона в этих условиях принимали равными $14\,290 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ [13].

Аналитический изотахофорез проводили на приборе 2127 Tachophor (ЛКВ, Швеция) в капилляре длиной 23 см. В качестве ведущего электролита использовали 0,005 MES-Ammediol, рН 8,8; буфер для заполнения капилляра содержал, кроме того, 0,3% метилцеллюлозы. В качестве замыкающего буфера применяли 0,01 М β -аланин — $\text{Ba}(\text{OH})_2$, рН 9,8. Образцы (4 мкл) содержали по 6 нмоль белка. Вместе с образцами вносили 1 мкл амфолинов (1% раствор), рН 5—8. Сила тока в начале опыта составляла 150 мкА, во время записи изотахофореграммы — 50 мкА. Определяли образцы по изменению поглощения при 280 нм. Температура на капиллярном плато составляла 13° С. Время опыта не превышало 20 мин.

ЛИТЕРАТУРА

1. Родионов Ю. В., Авилова Т. В., Захарова Е. В., Платоненкова Л. С., Егоров А. М., Березин И. В. (1977) Биохимия, **10**, 1896—1904.
2. Стронгин А. Я., Левин Е. Д., Степанов В. М. (1976) Биоорг. химия, **2**, 869—884.
3. «LKB 2127 Tachophor», Instruction. Manual (1977) LKB Producter AB, Bromma, Sweden.
4. Sollenberg I., Baldesten A. (1977) J. Chromatogr., **132**, 469—476.
5. Kopwille A., Lundin R., Sievertsson H. (1974) LKB Application Note, p. 159.
6. Delmotte P. (1977) Sci. Tools, **24**, 33—41.
7. Родионов Ю. В., Авилова Т. В., Попов В. О. (1977) Биохимия, **11**, 2021—2025.
8. Торчинский Ю. М. (1977) Сера в белках, с. 55—56, «Наука», М.
9. Попов В. О., Егоров А. М. (1979) Биохимия, **44**, 207—213.
10. Попов В. О., Родионов Ю. В., Егоров А. М., Березин И. В. (1978) Биоорг. химия, **4**, 117—128.
11. Блюменфельд Л. А. (1977) Проблемы биологической физики, с. 73—134, «Наука», М.
12. Кушнер В. П. (1976) Конформационная изменчивость и денатурация биополимеров, с. 147—186, «Наука», Л.
13. Торчинский Ю. М. (1977) Сера в белках, с. 129, «Наука», М.

Поступила в редакцию
3.XI.1978

После доработки
3.III.1979

ANALYTICAL ISOTACHOPHORESIS STUDY OF STRUCTURAL CHANGES IN FORMATE DEHYDROGENASE DURING INACTIVATION

DIKOV M. M., KARULIN A. Yu., OSIPOV A. P., EGOROV A. M.

Chemical Department, M. V. Lomonosov State University, Moscow

Inactivation of formate dehydrogenase was studied at 37 and 60° C using analytical isotachopheresis. At 37° C the inactivation which is caused by SH-group oxidation by air oxygen, is accompanied by small alterations in the enzyme structure. Formate dehydrogenase inactivation at 60° C results in a dramatic change of enzyme structure that leads in turn to the appearance of a number of inactive forms differing by isotachopheretic mobility.