

УДК 577.152.161

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ И РЕГУЛЯТОРНЫЕ СВОЙСТВА ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ИЗ ЛИСТЬЕВ ГОРОХА (*Pisum sativum* L.) В УСЛОВИЯХ ДЕФИЦИТА КИСЛОРОДА

© 2019 г. А. Т. Епринцев^{1, *}, Н. Р. Комарова¹, М. И. Фалалеева¹

¹Воронежский государственный университет, Воронеж, 394006, Россия

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

Поступила в редакцию 14.05.2018 г.

После доработки 11.09.2018 г.

Принята к публикации 25.09.2018 г.

При культивировании в условиях затопления в листьях гороха (*Pisum sativum* L.) индуцировалась активность лактатдегидрогеназы. Фермент был очищен до электрофоретически гомогенного состояния многостадийной очисткой, включающей фракционирование сульфатом аммония, ионообменную хроматографию на ДЭАЭ-целлюлозе и гель-хроматографию на Сефадексе G-200. Степень его очистки составила 101 раз, выход – 26.8%, а удельная активность 41.9 Е/мг белка. Изучены физико-химические свойства фермента. Определена молекулярная масса нативной молекулы лактатдегидрогеназы, равная 148 кДа, и показано, что она состоит из четырех одинаковых субъединиц, молекулярная масса которых, определенная методом электрофореза в ПААГ в присутствии ДДС-Na, равнялась 37 кДа. Изучены кинетические и регуляторные свойства фермента, включающие значения констант Михаэлиса и константы его ингибирования субстратом, а также влияние концентрации ионов водорода и температуры на его прямую и обратную реакцию.

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

DOI: 10.1134/S0555109919020077

Лактатдегидрогеназа (ЛДГ), катализирующая обратимое превращение пирувата в лактат, обеспечивая восстановление пировиноградной кислоты в гипоксических условиях, широко распространена в природе. При недостатке кислорода ее роль в растениях чрезвычайно важна при осуществлении метаболических приспособлений, связанных с изменениями путей клеточного дыхания. Для функционирования этого процесса необходима постоянная регенерация НАД⁺, катализируемая ЛДГ [1]. Фермент достаточно хорошо изучен у бактерий и животных. Ранее было установлено, что растительная ЛДГ участвует в краткосрочном (4 ч) ответе на гипоксический стресс [2]. В дополнение к предлагаемой ее роли в краткосрочном ответе на дефицит кислорода было показано участие в адаптивной реакции на действие гипоксии на растение в течение длительного (>8 ч) периода. Так, у растений ячменя, пшеницы, кукурузы и ржи уровень активности ЛДГ остается повышенным, по меньшей мере, в течение 6 сут [3, 4].

При электрофорезе фермента, экстрагированного из других растений, было обнаружено несколько компонентов, обладающих активностью ЛДГ, что интерпретировалось как присутствие

изоэнзимов, которые представляли собой тетрамеры, образованные двумя различными пептидными последовательностями [5]. В работе [6] показано неравномерное присутствие двух субъединиц в гипоксических корнях и проростках риса.

В настоящее время отсутствуют достаточное количество данных о физико-химических свойствах, кинетике и регуляции активности ЛДГ в растительных тканях. Для их изучения необходимо получить электрофоретически гомогенный фермент, поскольку ферментативная утилизация лактата, в некоторых растительных организмах осуществляется совместно со вспомогательным ферментом гликолатоксидазой [1].

Цель работы – выделение и очистка до электрофоретически гомогенного состояния ЛДГ из листьев гороха, выращенного в условиях кислородного дефицита, и изучение ее физико-химических и регуляторных свойств.

МЕТОДИКА

Растительный материал. В качестве объекта исследований использовали 9-суточные проростки гороха (*Pisum sativum* L., сорт Амброзия), выра-

щенные гидропонным методом при 25°C. Эти проростки были погружены в воду на 2–3 см выше корневой шейки для имитации условий дефицита кислорода. Через 48 ч растения были использованы для исследований [7].

Фермент экстрагировали из гомогенизированных листьев 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) и целевой белок гель-хроматографировали на колонке (2.0 × 30 см) с сефадексом G-200 (“GE Healthcare”, Швеция) по методике, описанной в работе [3].

Активность фермента измеряли на спектрофотометре (“ЛОМО СФ-56”, Россия) по скорости окисления НАДН при 340 нм. 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 [8]. 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 при 25°C образовывало (прямая реакция) или превращало (обратная реакция) 1 мкмоль НАДН.

Молекулярную массу белка определяли методом гель-фильтрации на колонке с сефадексом G-200, для калибровки которого был использован Dextran blue (2000 кДа). Для расчета использовали формулу

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

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

Молекулярную массу субъединиц оценивали методом электрофореза в 12%-ном ПААГ в присутствии ДДС-Na. В качестве белков-маркеров молекулярной массы использовали набор стандартных белков (кДа): б-галактозидаза (116.0), БСА (66.2), овальбумин (45.0), ЛДГ (35.0), REase Bsp198 (25.0), б-лактоглобулин (18.4) и лизоцим (14.4). Гели окрашивали нитратом серебра по методике [9].

Электрофорез ЛДГ проводили в 8%-ном ПААГ по методу Девиса в не денатурирующих условиях [10]. Для окрашивания гелей применяли нитрат серебра [9], для специфического определения фермента – тетразолиевый метод [11]. Определение белка проводили по методу Лоури.

Влияние рН на скорость ферментативной реакции изучали в 50 мМ трис-НСl-буфере, рН 5.0–10.0 [5].

Кинетические константы прямой и обратной реакций, катализируемых ЛДГ из листьев гороха, были определены методом Лайнуивера–Берка.

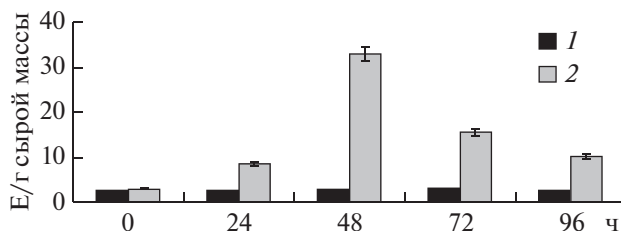


Рис. 1. Динамика изменения активности ЛДГ в листьях гороха в контроле (1) и в растениях после кислородного голодания (2).

Каталитические константы K_m , V_{max} и $E_{акт}$ для субстратов пируват и L-лактат определяли в стандартной реакционной смеси при рН 7.5 и 25°C. Концентрацию субстратов варьировали от 0 до 60.0 мМ, а концентрации других компонентов поддерживали постоянными [1].

Влияние температуры на скорость ферментативных реакций ЛДГ изучали в диапазоне температур реакционной смеси от 15 до 60°C.

Эксперименты проводили в 4–6 биологических повторностях, а аналитические определения – в трех. В табл. и на рис. приводятся результаты типичных опытов, каждое значение которых является средним арифметическим трех определений. Для расчета их достоверности использовали метод вариационной статистики с помощью критерия Стьюдента. Обсуждаются статистически достоверные различия при $p \leq 0.05$ [12]. Для построения графиков использовали данные, обработанные с помощью программ линейной и параболической аппроксимации.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Было установлено, что в листьях гороха, корни которого инкубированы в условиях недостатка кислорода, индуцировалась лактатдегидрогеназная активность. Максимальная активность ЛДГ была обнаружена после 2 сут их инкубирования (рис. 1), при этом уровень активности фермента увеличивался в 10–11 раз по сравнению с контрольными растениями. Для получения ЛДГ в высокоочищенном состоянии использовали листья гороха, инкубированные в условиях дефицита кислорода в течение 2 сут. Результаты очистки ЛДГ из листьев гороха приведены в табл. 1.

В результате многостадийной очистки был получен электрофоретически гомогенный фермент с высокой удельной активностью (41.9 Е/мг белка) и выходом (26.8%). При ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлоза максимальное количество лактатдегидрогеназной активности было десорбировано с носителя при элюции 350–500 мМ NaCl. При электрофорезе в ПААГ был обнаружен один белковый компонент с R_f – 0.38,



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

который окрашивался нитратом серебра (рис. 2). Этот компонент взаимодействовал с тетразолиевым синим, используемым для специфического определения активности ЛДГ (рис. 2). Таким образом, полученные результаты свидетельствовали о том, что очищенный белок ЛДГ был электрофоретически гомогенен и обладал лактатдегидрогеназной активностью.

Сравнение значений молекулярных масс нативной ЛДГ, полученной гель-хроматографией на сефадексе G-200, и фрагментов ЛДГ, определенных методом электрофореза в присутствии ДДС-Na, (рис. 3) позволило предположить, что молекула фермента обладала четвертичной структурой. Поскольку молекулярная масса его нативной мо-

лекулы составляла 148 кДа, а молекулярная масса одной субъединицы 37.1 кДа, то можно было допустить, что молекула ЛДГ из гороха представляла собой тетрамер.

Были установлены каталитические характеристики очищенного фермента. Значение константы Михаэлиса по пирувату составило 15 мкМ, что свидетельствовало о его высоком сродстве к субстрату (рис. 4). Низкая величина K_M ЛДГ при использовании пирувата могла свидетельствовать о высокой скорости окисления гликолитического НАДН [13].

Известно что, величина K_M ЛДГ из томата при использовании в качестве субстрата пирувата составляет 200 мкМ [14], а фермента, экстрагиро-

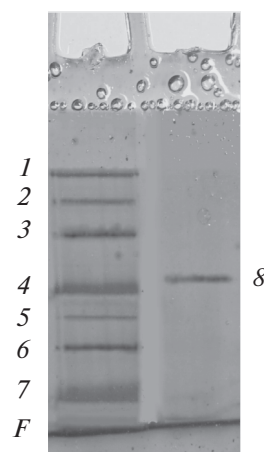


Рис. 3. Электрофорез в ПААГ в присутствии ДДС-Na очищенной лактадегидрогеназы (8). Белки-маркеры молекулярной массы (кДа): 1 – б-галактозидаза (116.0); 2 – БСА (66.2); 3 – овалбумин (45.0); 4 – ЛДГ (35.0); 5 – REase Bspl98 (25.0); 6 – β -лактоглобулин (18.4); 7 – лизоцим (14.4).

Таблица 1. Этапы очистки ЛДГ из листьев гороха *Pisum sativum* L. ($n = 3, p \leq 0.05$)

| Стадия очистки | Общий объем, мл | Общая активность, Е | Белок, мг | Удельная активность, Е/мг | Степень очистки | Выход, % |
|----------------------------------------------|-----------------|---------------------|-------------|---------------------------|-----------------|----------|
| Супернатант | 21.0 | 87.5 ± 2.6 | 211.7 ± 6.4 | 0.41 ± 0.01 | 1.0 | 100 |
| Фракционирование сульфатом аммония (35–65%) | 5.0 | 85.9 ± 2.6 | 56.1 ± 1.7 | 1.54 ± 0.05 | 3.7 | 98.2 |
| Гель-фильтрация через сефадекс G-25 | 2.5 | 72.5 ± 2.2 | 29.6 ± 1.0 | 2.45 ± 0.07 | 5.9 | 82.9 |
| Ионообменная хроматография на ДЭАЭ-целлюлоза | 3.0 | 28.1 ± 1.0 | 2.16 ± 0.07 | 13.0 ± 0.4 | 31.5 | 32.1 |
| Гель-хроматография на сефадексе G-200 | 2.5 | 23.4 ± 0.7 | 0.56 ± 0.01 | 41.9 ± 1.3 | 101.3 | 26.8 |

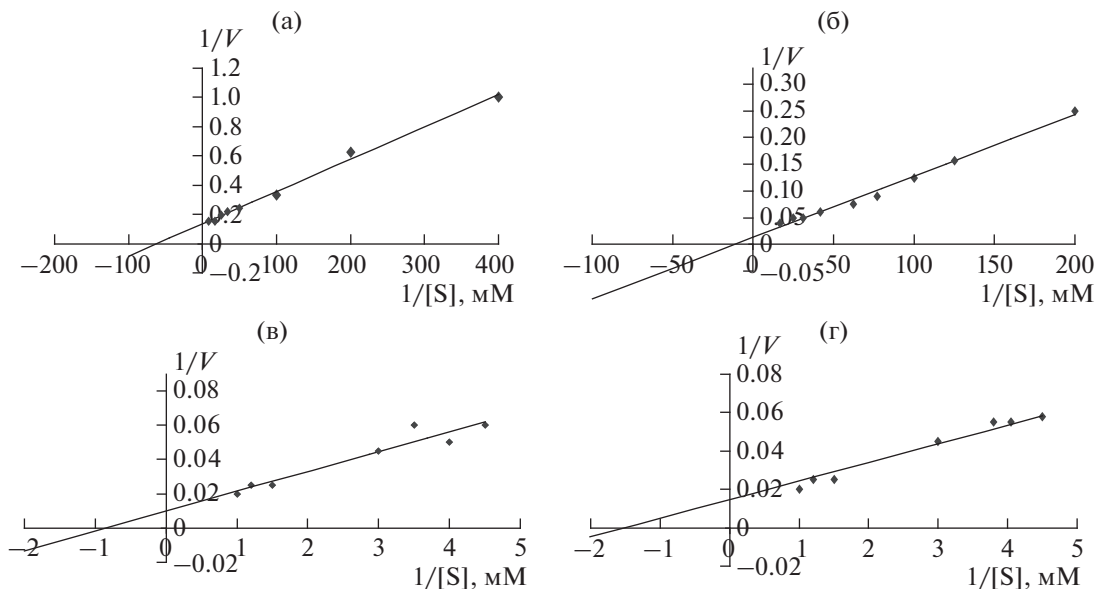


Рис. 4. Определение значений K_m ЛДГ из листьев гороха после кислородного голодания в течение 48 ч для пирувата (а), НАДН (б), лактата (в) и НАД⁺ (г).

ванного из мышц кролика – 48 мкМ [15]. Величина K_m при взаимодействии ЛДГ из листьев гороха с НАДН составила 71 мкМ (рис. 4), что свидетельствовало о ее достаточно высоком сродстве к данному коферменту. При этом показано, что значение этой константы колеблется от 8 до 77 мкМ для ЛДГ из мышц кроликов и из картофеля соответственно [5, 15, 16].

Для субстратов обратной реакции значения K_m выделенной ЛДГ оказались значительно выше, показывая меньшее сродство фермента к лактату и НАД⁺. Так, значение K_m по лактату составило 600 мкМ, а по НАД⁺ – 1.17 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 мышц кролика и картофеля составили 553–853 мкМ [15] и 11 мМ [5] соответственно, а для НАД⁺ – от 0.2 мМ для фермента из картофеля до 3.2 мМ – из печени крыс [5, 16].

О возможном сдвиге реакции, катализируемой очищенной ЛДГ из листьев гороха в сторону утилизации лактата, свидетельствовало низкое значение константы ингибирования субстратом – 1.15 мМ (рис. 5).

Была изучена термостабильность выделенной ЛДГ в интервале от 15 до 60°C. Температурный оптимум действия фермента при восстановлении пирувата составил 40°C, а при окислении лактата – 45°C (рис. 6). Это согласовывалось с температурными оптимумами ЛДГ из разных организмов, которые, как правило, находятся в пределах 30–60°C [6, 17]. Однако было установ-

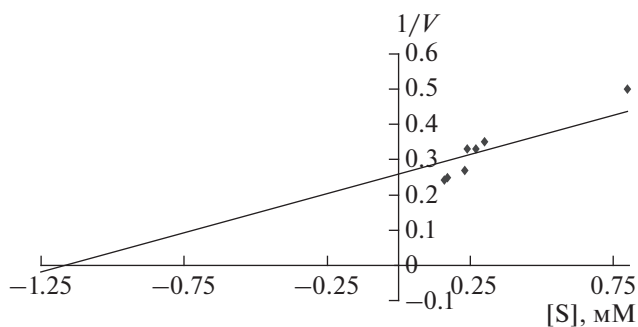


Рис. 5. Определение значения константы ингибирования для ЛДГ из листьев гороха после кислородного голодания в течение 48 ч

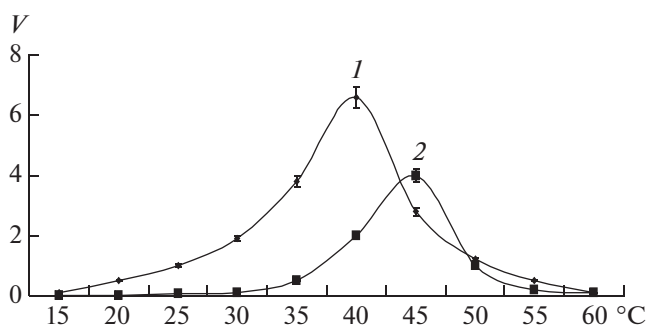


Рис. 6. Влияние температуры на скорость реакций восстановления пирувата (1) и окисления лактата (2), катализируемых ЛДГ из листьев гороха.

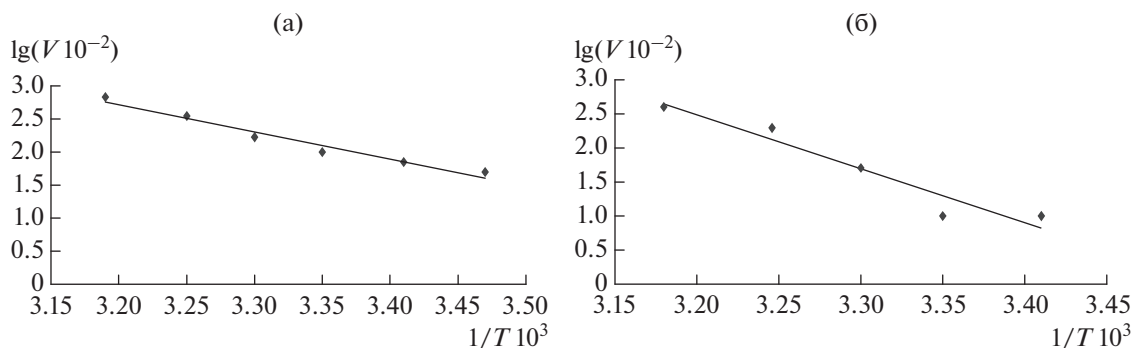


Рис. 7. График Аррениуса для ЛДГ из листьев гороха при восстановлении пирувата (а) и при окислении лактата (б).

лено, что ЛДГ из растений (томат и картофель) обладают максимальной активностью около 40°C [6, 18].

На основе полученных данных были построены графики Аррениуса для реакций восстановления пирувата и окисления лактата (рис. 7), позволившие рассчитать значения энергии активации ($E_{\text{акт}}$) для переходного состояния фермент-субстратного комплекса. Графики Аррениуса для ЛДГ из листьев гороха описывались прямыми линиями, что свидетельствовало о том, что молекула фермента обладала одним конформационным состоянием [19]. Вычисленные значения энергии активации выделенной ЛДГ составили для прямой и обратной реакций 4.7 и 5.3 кДж/моль соответственно. Следует отметить, что эти значения варьируют у ферментов, выделенных из различных организмов. Так, у растений ячменя ЛДГ характеризуется энергией активации, равной 11 кДж/моль [5], у креветки и трески 44.8 [16] и 55 кДж/моль [20] соответственно.

Изучение влияния концентрации ионов водорода на активность выделенной ЛДГ показало, что оптимальное значение pH для протекания прямой реакции составляло 7.5 и для обратной — 8.8 (рис. 8). По данным работ [21, 22] при pH 7.0

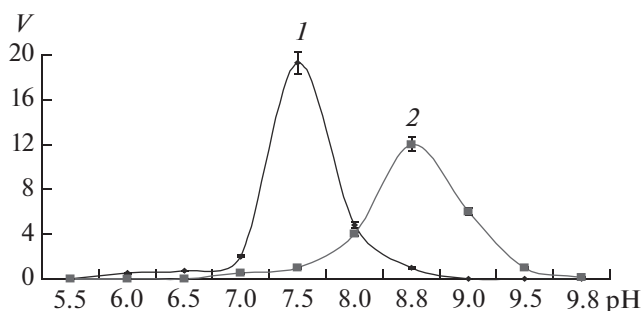


Рис. 8. Зависимость скорости реакции от pH среды для ЛДГ из листьев гороха при восстановлении пирувата (1) и при окислении лактата (2).

равновесие реакции смещено в сторону образования лактата, а в щелочной среде *in vivo* реакция осуществляется в обратном направлении. По мере изменения pH ионизация групп, как активного центра фермента, так и субстрата может изменяться, что влияет на скорость связывания субстрата с активным центром. ЛДГ у большинства организмов проявляет максимальную активность при значениях pH, близких к нейтральным [15, 23, 24].

При использовании гомогенного препарата ЛДГ важное значение приобретает разработка способа сохранения его активности. Было установлено, что очищенная ЛДГ полностью сохраняла стабильность при хранении в морозильной камере при -74°C в течение 6 мес.

Таким образом, с помощью многостадийной очистки из листьев гороха, корни которого инкубировались в условиях недостатка кислорода, была получена электрофоретически гомогенная ЛДГ. Были изучены физико-химические и каталитические свойства фермента. Установлено, что его молекула представляла собой гомотетрамер, состоящий из четырех одинаковых субъединиц. Показано, что ЛДГ из листьев гороха обладала более высоким сродством к пирувату, по сравнению с лактатом, что позволяло ей активно участвовать в реокислении гликолитического НАДН. Оптимальная для работы выделенного фермента температура составляла 40°C для прямой и 45°C для обратной реакции. Обнаружено, что оптимальное значение pH для катализа восстановления пирувата — 7.5, и окисления лактата — 8.8 [1, 16]. Полученные данные открывают перспективы для изучения роли ЛДГ (совместно с гликолатоксидазой, подобной L-лактат-цитохром с-оксидоредуктазе дрожжей) в адаптивной реакции клеточного метаболизма к гипоксическим условиям, возникающим в корне при затоплении [1].

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований (№ 17-04-01039).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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.
2. Davies D.D., Grego S., Kenworthy P. // *Planta.* 1974. V. 118. № 4. P. 297–310.
3. Hoffman N.E., Hanson A.D. // *Plant Physiol.* 1986. V. 82. № 3. P. 664–670.
4. Good A.G., Crosby W.L. // *Plant Physiol.* 1989. V. 90. № 3. P. 860–866.
5. Mulcahy P., O'Carra P. // *Phytochemistry.* 1997. V. 45. № 5. P. 889–896.
6. Rivoal J., Richard B., Pradet A. // *Plant Physiol.* 1991. V. 95. № 3. P. 682–686.
7. Jain V., Singla N.K., Jain S., Gupta K. // *Physiol. Mol. Biol. Plants.* 2010. V. 16. № 3. P. 241–247.
8. Setsuko K., Takahiro M., Hiroshi Y. // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 6. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3683008>.
9. Shevchenko A., Wilm M., Vorm O. // *Anal. Chem.* 1996. V. 68. № 5. P. 850–858.
10. Davis B.J., Ornstein L. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1964. V. 121. № 2. P. 404–427.
11. Fieldes M.A. // *Electrophoresis.* 1992. V. 13. № 1–2. P. 82–86.
12. Лакун Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа, 1990. 352 с.
13. Zheng Y., Si X., He Q., Jin S., Hong J. // *Essays Biochem.* 2008. 2015. V. 59. P. 1–41. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26504249>.
14. Davies D.D., Davies S. // *Biochem. J.* 1972. V. 129. № 2. P. 831–839.
15. Kohashi M., Kasuya Y., Watanabe T. // *Biosci., Biotechnol. Biochem.* 1996. V. 60. № 2. P. 284–287.
16. 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. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28625911>.
17. Xia J.-H., Roberts J.K.M. // *Plant Physiol.* 1994. V. 105. № 2. P. 651–657.
18. Rivoal J., Hanson A.D. // *Plant Physiol.* 1994. V. 106. № 3. P. 1179–1185.
19. Блюменфельд Л.А. Решаемые и нерешаемые проблемы онкологической физики. М.: Едиториал УРСС, 2002. 160 с.
20. Zakhartsev M.V., Pörtner H.O., Blust R. // *Anal. Biochem.* 2004. V. 330. № 1. P. 10–20.
21. Берестовская В.С. // *Terra Medica.* 2008. № 1. С. 17.
22. Артюхов В.Г., Наквасина М.А. Биологические мембраны: структурная организация, функции, модификация физико-химическими агентами. Воронеж: ВГУ, 2000. 296 с.
23. Sweetlove L.J., Dunford R., Ratcliffe R.G., Kruger N.J. // *Plant Cell Environ.* 2000. V. 23. № 8. P. 873–881.
24. Xia J.-H., Saglio M. // *Plant Physiol.* 1992. V. 100. № 1. P. 40–46.

Physicochemical and Regulatory Properties of Lactatdehydrogenase from Pea Leaves (*Pisum sativum* L.) in the Conditions of Oxygen Deficiency

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

^aVoronezh State University, Voronezh, 394018 Russia

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

Received May 14, 2018

Revised September 11, 2018

Accepted September 25, 2018

In pea leaves (*Pisum sativum* L.) lactate dehydrogenase activity (LDH, E.C. 1.1.1.27) was induced by culturing under flood conditions. Using a multi-stage purification process including ammonium sulfate fractionation, ion-exchange chromatography on DEAE-sephacel and gel chromatography on Sephadex G-200, the enzyme was purified to an electrophoretically homogeneous state. The LDH preparation had a specific activity of 41.9 E/mg protein, with a purification rate of 101 and a yield of 26.8%. Its physical and chemical properties are studied. The molecular weight of the native LDH molecule (148 kDa) was determined, the enzyme was shown to consist of four subunits, the molecular mass of which was determined by PAGE-Na electrophoresis in the presence of DDS-Na equal to 37 kDa. The kinetic and regulatory properties are studied: the Michaelis constants values, the substrate inhibition constants, the effect of hydrogen ion concentration and temperature on the direct and reverse reaction.

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