

УДК 577.151.042

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

© Е.А. САБУРОВА, Н.Б. СИМОНОВА, Н.А. ПРОНИНА,
Т.Н. ФОЛЬКОВИЧ, В.Е. СЕМЕНЕНКО**ВЛИЯНИЕ ВЯЗКОСТИ НА ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА
ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ИЗ *DUNALIELLA SALINA****(Представлено академиком А.Т. Мокроносовым 21 V 1992)*

Функционирование любых ферментных систем в живых организмах происходит в условиях, эволюционно адаптированных для их оптимальной работы. Стабильность конформации, кинетические характеристики ферментов, определяющие нужный метаболизм и передачу информации в клетке, предъявляют особые требования к свойствам внутриклеточной среды: рН, содержание воды, отношение K^+/Na^+ ионов, а также наличие нужных осмолитов. Хорошо известно, что высокие концентрации неорганических солей NaCl и KCl нарушают структуру ферментов, приводя к полной потере активности ферментов [1] в организмах, адаптированных к низкой концентрации соли в клетке. Поэтому в случае изменения содержания соли во внешней среде клетки отвечают на эти изменения синтезом различного рода осмолитов [2]. Наиболее ярко этот эффект проявляется в галофильных одноклеточных водорослях *Dunaliella salina*. При повышении концентрации NaCl во внешней среде в клетках *D. salina* происходит быстрый синтез глицерина, внутриклеточная концентрация которого достигает 10 М [3]. Образовавшийся глицерин предохраняет клетку от осмотического шока, поскольку содержание соли в клетке остается низким, не более 0,5 М [4]. И наоборот, при снижении внешней концентрации соли клетка снова восстанавливает прежнее содержание глицерина специфическими для этого процесса ферментами. Глицерин дегидратируется, затем фосфорилируется и образовавшийся при этом дигидроксиацетонфосфат переходит в полисахаридный пул клетки, который осмотически не активен. Таким образом, дигидроксиацетонфосфат — это та точка, в которой перекрываются два метаболических пути: гликолиз и превращения глицерина [5]. Хорошо известно, что глицерин является консервирующим для белков соединением, при этом он повышает температуру и энергию активации белков [5]. Но с другой стороны, нами показано на примере лактатдегидрогеназы из мышц свиньи, что высокие концентрации глицерина приводят к полной потере активности [6]. Было подробно исследовано, на какой стадии катализа действие глицерина наиболее существенно. В результате таких исследований показано, что уменьшение активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ) вызвано не падением диффузионной подвижности субстратов, как это можно было бы ожидать (сродство к субстратам, напротив, растет), а заторможенностью конформационных изменений в молекуле белка, т.е. заторможенностью движений полипептидного остова, которыми сопровождается каталитический акт [7]. В связи с этим функционирование ферментов при такой высокой концентрации глицерина, которая имеется в клетках *D. salina*, наиболее удивительно с точки зрения всех фактов, имеющих к настоящему времени о влиянии глицерина на конформационные и функциональные свойства белков.

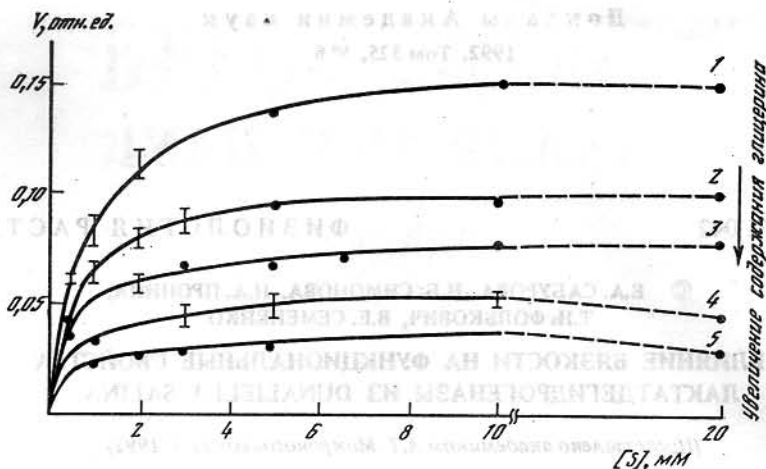


Рис. 1. Зависимость активности ЛДГ от концентрации пирувата при разных концентрациях глицерина: 1 — без глицерина; 2 — 12,5; 3 — 25; 4 — 50; 5 — 63% весового содержания глицерина в 0,2 М фосфатном буфере, pH 7,5

Целью настоящей работы было изучить зависимость ферментативной активности некоторых ключевых ферментов от вязкости среды. Эта работа посвящена исследованию влияния глицерина на каталитические характеристики одного из ключевых ферментов гликолиза — ЛДГ. Поскольку этот фермент хорошо изучен структурно и функционально для большого числа видов растений и животных, то выявление особых свойств его в *D. salina* в сравнительном аспекте, мы надеемся, поможет понять наиболее тонкие механизмы, лежащие в основе построения макромолекул, функционирующих в средах с повышенной вязкостью.

В работе использовали штамм водоросли *D. salina* Теод: Д-209 из коллекции водорослей Института физиологии растений РАН. Выращивание культуры и контроль за скоростью роста водоросли производили, как в работе [8].

В настоящем исследовании мы работали с гомогенатом клеток *D. salina*, а не с изолированным ферментом, так как при выделении фермента возможны потери некоторых изоформ ЛДГ и картина может исказиться, как это было в случае ЛДГ из картофеля [9]. Поскольку в настоящем исследовании речь идет об адаптационных механизмах клеток растения к повышенной концентрации глицерина, то мы сочли целесообразным исследовать стабильность ЛДГ в клеточном экстракте. Активность ЛДГ из мышц свиньи определяли в аналогичных условиях с той лишь разницей, что фермент был выделен в чистом виде, как в работе [6].

На рис. 1 показаны кривые насыщения фермента по пирувату в реакции восстановления пирувата при разных значениях вязкости. Как видно из рис. 1, все кривые описываются уравнением Михаэлиса и хорошо спрямляются в двойных обратных координатах. Из этих кривых были получены величины K_M и V_{max} , которые представлены в табл. 1.

Как видно из табл. 1, V_{max} и K_M являются функциями концентрации глицерина. С увеличением концентрации глицерина V_{max} значительно падает, сродство с пируватом увеличивается, что отражено в снижении K_M (примерно в 2 раза при 50% глицерина). Зависимость V_{max} от вязкости дана на рис. 2 в двойных логарифмических координатах (кривая 1). Эта кривая удовлетворяет уравнению Крамерса [10], представляя собой прямую в этих координатах с коэффициентом $\delta = 0,42$.

Уравнение Крамерса, описывающее зависимость константы скорости реакции

Таблица 1

Значения K_M и V_{max} , вычисленные из рис. 1 в реакции превращения пирувата, катализируемой ЛДГ из *D. salina*

$C_{\text{глицерина}}$, % по массе	K_M , мМ	V_{max} , %
0	0,5	100
12,5	0,45	95
25	0,42	75
50	0,26	45
63	0,18	28

от вязкости и температуры, имеет вид

$$(1) \quad k = A\eta^{-\delta} \exp(-E_a^*/RT),$$

где E_a^* — энергия активации, не зависящая от вязкости. Здесь параметр δ характеризует чувствительность релаксационных свойств белка к изменению релаксационных свойств внешней среды. Обычно эта величина меняется в пределах $0 < \delta < 1$ для разного рода процессов [11]. Далее мы подробнее остановимся на этом.

На рис. 2 приведена также аналогичная зависимость для ЛДГ из мышц свиньи (кривые 2, 4). Мы выбрали этот белок для сравнения, с одной стороны, из-за того, что в мышечных клетках млекопитающих поддерживается строго постоянное значение концентрации NaCl и KCl в цитозоле (0,14–0,2 М) [12] и отсутствует такое количество глицерина, как в клетках *D. salina*, и, с другой стороны, как мы уже говорили, этот фермент нами был наиболее изучен в отношении влияния глицерина [6]. Следует отметить, что кинетические кривые для обоих ферментов исследованы в условиях, наиболее близких к условиям их функционирования в клетке (рН и концентрация соли). Мы исследовали также влияние глицерина на ферментативную активность ЛДГ при физиологических концентрациях пирувата (0,2 мМ) — кривые 3 и 2 рис. 2 для *D. salina* и мышечного. Как видно из сравнения действия фермента из водоросли и мышц свиньи и в случае низких концентраций пирувата, и, тем более, высоких имеется большая разница в устойчивости этих ферментов к высоким концентрациям глицерина. Величина δ значительно выше для фермента из мышц млекопитающих: $\delta = 0,12$ из водоросли и 0,55 из мышц свиньи при низких концентрациях пирувата и $\delta = 0,42$ и 0,98 соответственно при высоких концентрациях пирувата. Таким образом, ЛДГ из *D. salina* наиболее толерантна к изменению содержания глицерина.

Следует отметить, что кривые 3 и 4 рис. 2 не являются строго прямыми с одним наклоном: кривая 3, относящаяся к ЛДГ из *D. salina*, имеет очень слабую зависимость от вязкости ($\delta = 0,12$) при изменении концентрации глицерина от 0 до 7 М и далее наклон возрастает до 0,32. Это означает, что фермент в широкой области концентраций глицерина практически не чувствителен к наличию глицерина в клетке именно при той концентрации глицерина, которая является осмотически равновесной при внешнем увеличении концентрации соли вплоть до 4 М. При дальнейшем увеличении концентрации глицерина более 7 М наклон кривой растет, но остается ниже, чем для ЛДГ из мышц ($\delta = 0,32$ и 0,38 соответственно). Зависимость скорости реакции от вязкости для мышечного ЛДГ также имеет вид двух прямых, но с другим соотношением наклонов: при малых значениях вязкости наклон кривой наибольший — $\delta = 0,98$, при дальнейшем повышении концентрации глицерина более 5 М уменьшается до значения $\delta = 0,38$. Отклонение от прямой зависимости V от η означает, что измеряемая скорость определяется не одной константой скорости,

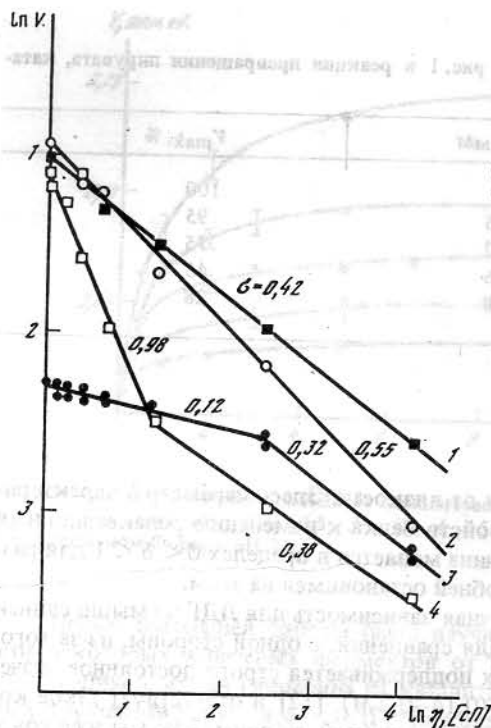


Рис. 2. Зависимость скорости реакции от концентрации глицерина, построенная в двойных логарифмических координатах. 1, 3 — для реакций, катализируемых ЛДГ из *D. salina*; 2, 4 — для реакций, катализируемых ЛДГ из мышц свиньи; 2, 3 — данные, полученные при $C_{\text{пирувата}} = 0,2 \text{ мМ}$, 1, 4 — при $C_{\text{пирувата}} = 10 \text{ мМ}$. δ — наклон линейного участка кривой (см. в тексте)

а совокупностью нескольких, по крайней мере двух, процессов. Наличие двух наклонов на кривой 2 можно объяснить наиболее просто следующим способом. При концентрациях пирувата $0,2 \text{ мМ}$, при которых снята эта кривая, уравнение для скорости имеет вид

$$V = k_{\text{cat}}S / (K_M + S).$$

Величина $K_M = 0,7 \text{ мМ}$, т.е. в 3,5 раза больше значения S . В этом уравнении от вязкости зависят две константы: k_{cat} и K_M (табл. 1). Так, при 50%-ной концентрации глицерина $K_M = 0,26 \text{ мМ}$, т.е. в 3 раза меньше, чем $K_M = 0,7 \text{ мМ}$ в отсутствие глицерина, и меньше, чем S . Таким образом, при малых концентрациях глицерина, пока $K_M > S$, можно пренебречь по сравнению с K_M ; уравнение для скорости имеет вид

$$V = \frac{k_{\text{cat}}}{K_M} \cdot S.$$

Если эффективные показатели степени при вязкости для обеих констант близки, то зависимость скорости реакции от η будет слабо выражена, так как числитель и знаменатель компенсируют друг друга. В нашем случае эта величина равна $\delta = 0,12$ (начальный наклон на кривой 3). Из построения зависимости K_M от вязкости в первом приближении именно такое соотношение и получается. Строго говоря, K_M — это константа равновесная и зависит от трех констант скорости. Но поскольку $k_{\text{const}} \ll k_{+1}, k_{-1}$ [12], то можно ее считать, с хорошей точностью, равновесной константой диссоциации для пирувата. Не вдаваясь в подробный анализ зависимости констант скоростей от вязкости для связывания и отщепления пирувата, ибо для этого нужны методы скоростной кинетики, из приведенных экспериментов следует, что отсутствие линейности кривых 3 и 4 можно объяснить с хоро-

шей точностью указанным способом. Объяснение же нелинейности кривой 4 рис. 2 более сложно, хотя в основе его лежат те же соображения. Напомним, что кривая 3 представляет зависимость скорости катализа от вязкости для ЛДГ из мышц свиньи. Кинетика этого фермента усложнена тем, что при больших концентрациях пирувата проявляется субстратное ингибирование. Следовательно, если зависимость от вязкости линейна для V_{\max} (V_{\max} получена экстраполяцией из графиков Лайнуивера-Берка [6]), то при больших концентрациях пирувата ($S \gg K_M$) линейность нарушается этим дополнительным эффектом.

Резюмируя сказанное, можно прийти к выводу, что наиболее существенным результатом является тот факт, что при всех изученных условиях, в том числе при физиологических pH и физиологических концентрациях пирувата, фермент из *D. salina* является более толерантным к изменению вязкости среды, чем мышечный фермент.

В настоящем анализе мы мало останавливались на том, почему константа диссоциации для субстрата при увеличении вязкости среды не только не увеличивается, а напротив, в несколько раз уменьшается, т.е. увеличивается сродство к пирувату. Аналогичный результат получен нами ранее для мышечного фермента [6]. В предыдущей работе мы исследовали влияние диэлектрической постоянной среды на все перечисленные константы путем вариации растворителя с разным значением ϵ . В результате этого исследования показано, что ни k_{cat} , ни K_M не зависят от ϵ среды. Этот результат подтверждает высказанное ранее предположение, что основной вклад в энергию взаимодействия субстрата с ферментом определяется не электростатическими взаимодействиями заряженного субстрата с фиксированным распределением зарядов в активном центре фермента, а энергией гидратации субстрата или его аналогов, в том числе конкурентных ионов. Таким образом, сродство к субстрату определяется полярностью внутренней среды в активном центре фермента и способностью гидратировать воду. ЛДГ создает среду в активном центре с низкой диэлектрической постоянной ($\epsilon \sim 3$) [13], и переход гидрид-иона происходит в экранированной от растворителя среде. Этот переход сопровождается конформационными изменениями в белке с временами релаксации порядка миллисекунды [12].

Хорошо известно, что в работе любого фермента принимает участие не только локально сформированный каталитический центр, но и вся молекула в целом. Речь идет не только о том, что вся молекула создает определенную полярность внутри активного центра, но также и о динамических свойствах относительно дальних от центра участков молекулы фермента, обеспечивающих необходимую жесткость структуры полипептидного остова. В тех белковых структурах, в которых катализ сопровождается относительно большими сдвигами участков полипептидной цепи (например, движение петли на несколько ангстрем в ЛДГ при связывании пирувата), влияние вязкости должно быть значительным. Отсюда возникла возможность воздействия на элементарные стадии биокаталитического процесса путем влияния на динамику молекул среды.

Интересно в связи с этим отметить, что для огромного количества ферментов из большого числа организмов, как показано в многочисленных работах В.Я. Александрова [14], выявлена корреляция между теплолюбивостью видов и устойчивостью их ферментов к тепловой денатурации. Самое удивительное в такой коррекции состоит в том, что температура денатурации этих ферментов на 30–40 °C выше температуры обитания вида и на 15–20 °C выше температуры разрушения клетки. Тем не менее, ферменты этих организмов сохраняют разницу в температурах денатурации на 5–7 °C, аналогичную разнице в температурах обитания видов. Такое тонкое, но устойчивое для большинства ферментов различие интерпретируется автором именно с позиций динамической жесткости полипептидной структуры, необходимой для катализа при разных температурах обитания. Как мы видим из результатов нашей

работы, аналогичная корреляция получена и по отношению к повышенному содержанию глицерина в клетке. Как видно из результатов наших экспериментов, такая корреляция имеет место и в области физиологических концентраций глицерина, и при высоких концентрациях (рис. 2).

Похоже, что увеличение вязкости и снижение температуры являются в основе своего воздействия на катализ равнозначными, хотя взаимозаменяемыми процессами. Например, уменьшение температур раствора на 10°C от 30 до 20°C приводит к уменьшению активности ЛДГ из мышц свиньи в 4 раза. Такое же изменение скорости фермента происходит при добавлении глицерина до концентрации 50%. Хотя изменение температуры воды на 10°C практически не меняет ее вязкости ($\Delta\eta = 0,92$ спуаз), однако такое изменение температуры по действию на активность эквивалентно изменению вязкости $\Delta\eta \sim 10^3$ спуаз. Заторможенность движения петли на ферменте при снижении температуры определяется экспоненциальной зависимостью скорости реакции от температуры (1). Отсюда становится понятным, что увеличение активационного барьера для протекания ферментативной реакции вызвано заторможенностью вращательных степеней свободы в белке в присутствии глицерина, образующего, по всей видимости, дополнительные водородные связи с молекулой белка.

Возможно, увеличение жесткости конформации в присутствии глицерина вызвано не только изменением релаксационных свойств аминокислотных остатков, но и разным изменением растворимости полярных и неполярных остатков, что может создавать дополнительную жесткость структуры. Так или иначе, этот процесс требует дальнейшего детального изучения большой совокупностью кинетических и структурных методов.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики
Российской Академии наук, Пущино, Московской обл.
Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева
Российской Академии наук, Москва

Поступило
21 V 1992

ЛИТЕРАТУРА

1. Warren J.C., Stowring L., Morales M.F. — J. Biol. Chem., 1966, vol. 241, p. 309.
2. Хочачка П., Сомеро Дж. В кн.: Биохимическая адаптация. М.: Мир, 1988, с. 337.
3. Ben-Avotz A., Avron M. — Trends Biochem. Sci., 1981, vol. 6, p. 267–299.
4. Баллокин Ю.В. и др. — Журн. общ. биол., 1990, т. 51, с. 234–246.
5. Ленинджер А. В кн.: Биохимия. М.: Мир, 1974, с. 565.
6. Сабурова Е.А., Каменчук И.О., Демченко А.П. — Мол. биол., 1988, т. 22, с. 718–725.
7. Demchenko A., Rusyn O., Saburova E.A. — Biochem. et biophys. acta, 1989, vol. 998, p. 196–203.
8. Семенов В.Е., Абдулаев А.А. — Физиол. раст., 1980, т. 27, с. 31–41.
9. Asker H., Davies D. — Planta, 1984, vol. 161, p. 272–280.
10. Шайтан К.В., Рубин А.Б. — Биофизика, 1985, т. 30, с. 517–527.
11. Хоцтария Д.Э., Гозуадзе Н.Г. — Биофизика, 1986, т. 31, с. 391–395.
12. Waldman A.D.B., Clarke I., Holbrook J.J. — Biochem. Soc. Trans. 1985, vol. 13, p. 257–267.
13. Tanford C., Roxby R. — Biochemistry, 1972, vol. 11, p. 2192–2198.
14. Александров В.Я. Клетки, макромолекулы и температура. Л.: Наука, 1975.