

УДК 577.051.042

## КИНЕТИКА И СТАБИЛЬНОСТЬ ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ИЗ ДВУХ ВИДОВ ВОДОРΟΣЛЕЙ, ЖИВУЩИХ В СРЕДЕ С РАЗНЫМ СОДЕРЖАНИЕМ СОЛИ: *DUNALIELLA SALINA* И *CHLAMYDOMONAS*; pH-ЗАВИСИМОСТЬ

© 1994 г. Н. Б. Симонова, Е. А. Сабурова, Т. Н. Фалькович, В. Е. Семенов

Представлено академиком А.Т. Мокроносовым 29.09.93 г.

Поступило 19.10.93 г.

Особое место в регуляции ферментативных процессов занимает величина pH в клетке. Этот параметр определяет состояние связанности ферментов на мембранах или в энзиматических компартаментах [1].

Величина pH в клетке изменяет состояние связанности белков путем неспецифического изменения растворимости белков в водно-органических растворах. Кроме того, pH влияет на стерическую конфигурацию активного центра и, соответственно, гибкость данной конфигурации и определяет величину сродства фермента к субстратам. В основе всех этих процессов лежит особенность взаимодействия белков с водой, активность которой, в свою очередь, определяется наличием различных метаболитов и ионов.

В основе эволюционных изменений фермент-субстратного сродства лежат два важных принципа. С одной стороны, это сродство должно быть очень высоким, чтобы обеспечить эффективный катализ при низких концентрациях субстратов, и это обеспечивается определенной конфигурацией зарядов в активном центре фермента. С другой стороны, оно должно быть таким, чтобы фермент не насыщался субстратом (т.е. работал значительно ниже уровня  $V_{max}$ ) для исключения опасности быстрого накопления субстрата при увеличении потока метаболитов. Это достигается обычно динамическим равновесием заряда аминокислотных остатков, участвующих в катализе. Например, рК гистидина, наиболее часто непосредственно участвующего в катализе ферментами, имеет величину, близкую к pH, которое эволюционно установилось и строго поддерживается клеткой в процессе ее жизнедеятельности. Эта стратегия ре-

гуляции pH получила название "альфа-статной регуляции" [2].

В работе [3] мы показали, что величина  $pK_{эфф}$  гистидина 195 в лактатдегидрогеназе (ЛДГ) из мышц свиньи может изменяться в зависимости от концентрации субстрата и концентраций анионов нейтральных солей. Это свидетельствует о наличии широких возможностей в клетке для регуляции метаболических потоков в условиях аноксии и солевого стресса. Однако механизм связывания лигандов, величина  $\alpha_{минд}$ , сохранение величин  $K_m$  и обратимость реакции специфичны для каждого вида организмов. Известно, что одноклеточные зеленые водоросли *Dunaliella* живут в широком диапазоне pH среды (1.0 - 11.0), при этом внутриклеточное значение pH у них различается незначительно [4]. То же можно сказать и о концентрации соли во внешней среде: при наличии насыщенных концентраций соли в среде обитания содержание соли внутри клетки *D. salina* не превышает 0.4 М КСl. Осмотическое равновесие достигается в этих клетках высокими концентрациями глицерина внутри клетки (до 5М) [5].

Такие уникальные условия для функционирования ферментов в клетках *D. salina* позволяют предположить наличие специфических особенностей, позволяющих функционировать им при высоких концентрациях глицерина. Одна из таких особенностей в клетках *D. salina*, живущей при концентрации соли 2.5 М и pH 7.5, установлена нами [6]. Изучение влияния вязкости среды (увеличение концентрации глицерина) на кинетические характеристики ЛДГ из *D. salina* показало, что ЛДГ из *D. salina* более устойчива к инактивации высокими концентрациями глицерина, чем ЛДГ из мышц свиньи, а также чем ЛДГ из одноклеточной зеленой водоросли *Chlamydomonas*, содержание глицерина в которых на два порядка ниже, чем в *D. salina*.

В настоящей работе мы исследовали кинетические характеристики и стабильность ЛДГ из двух видов одноклеточных водорослей, живущих

*Институт теоретической и экспериментальной  
биофизики Российской Академии наук,  
Пушино Московской обл.*

*Институт физиологии растений  
им. К.А. Тимирязева Российской Академии наук,  
Москва*

в среде с разным содержанием соли, — *D. salina* и *Chlamydomonas*, в зависимости от pH среды.

В работе использовали штамм водоросли *D. salina* Teod. Д-209 из коллекции культур микроводорослей Института физиологии растений РАН (ИРПАС). Выращивание культуры и контроль за скоростью роста водоросли производили согласно [7].

Водоросли *Chlamydomonas reihardtii* Dang, штамм ИПФ К+ (137С+) получены из коллекции водорослей Института почвоведения и фотосинтеза РАН, Пущино [8]. Выращивание культуры и контроль за скоростью роста производили по методу [9].

Получение экстракта и измерение активности фермента производили, как в работе [6].

На рис. 1 приведена зависимость активности ЛДГ, определяемая по скорости восстановления пирувата, от pH раствора для фермента из *D. salina* (кривая 2) и *Chlamydomonas* (кривая 1). Концентрации пирувата и НАД-Н выбраны, исходя из условий насыщения этими субстратами при pH 7.5. Как видно из рис. 1, активность фермента одинакова в диапазоне pH 5.4 - 8.0 и резко начинает снижаться при pH выше 8.0. В области pH 5.4 - 8.0 кинетические кривые продукт-время линейны. При pH больше 8.0 линейность нарушается из-за уменьшения скорости реакции от времени в процессе измерения активности, причем такое уменьшение скорости имеет место только для ЛДГ из *D. salina*, для ЛДГ из *Chlamydomonas* скорость реакции не изменяется в течение 30 мин во всем измеренном диапазоне pH. На рис. 2 приведены две такие кривые при pH 7.5 и 8.9 для *D. salina*. Кривая 1 при pH 7.5 линейна на всем измеряемом промежутке времени, т.е. наклон не зависит от времени. Кривая 2 хорошо аппроксимируется одной экспонентой с показателем степени, соответствующим  $k_{ин} = 0.016 \text{ с}^{-1}$ .

Аналогичные кривые, как на рис. 2, получены при разных значениях pH, вплоть до pH 9.0;  $k_{ин}$  вычислены из этих кривых и построены как функция pH (рис. 3). Как видно из рис. 3, константа скорости инактивации  $k_{ин}$  практически равна нулю в нейтральной области pH и резко увеличивается при pH больше 8.0. Это свойство, впервые обнаруженное нами для ЛДГ из *D. salina*, отсутствует для ЛДГ из *Chlamydomonas* (данные этой работы) и ЛДГ из других известных нам источников [10]. Возникает вопрос, является ли эта инактивация ЛДГ из *D. salina* конформационной нестабильностью фермента при щелочных значениях pH в результате ионизационного состояния аминокислотных остатков на белке, или является следствием гидролиза фермента протеазами. Последний случай также имеет по крайней мере две причины: первая — активация протеаз в щелочной среде, вторая — конформационные изменения в ЛДГ под действием pH, которое делает

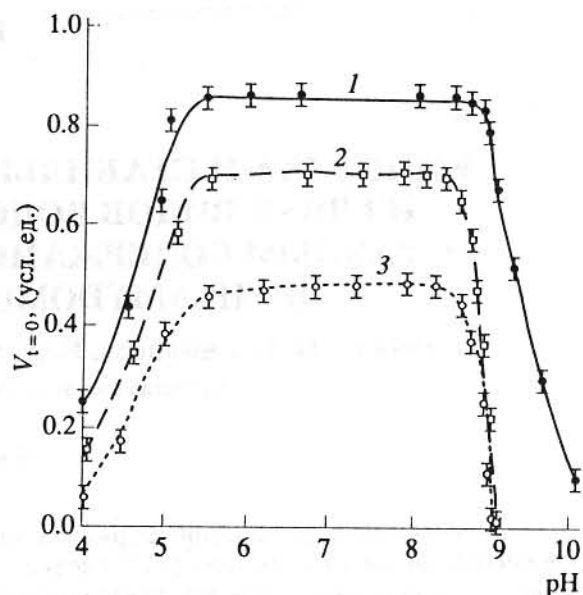


Рис. 1. Зависимость скорости восстановления пирувата от pH, катализируемого ЛДГ. 1 — из *Chlamydomonas*, 2 — из *D. salina*, 3 — из *D. salina* + 4М глицерин.

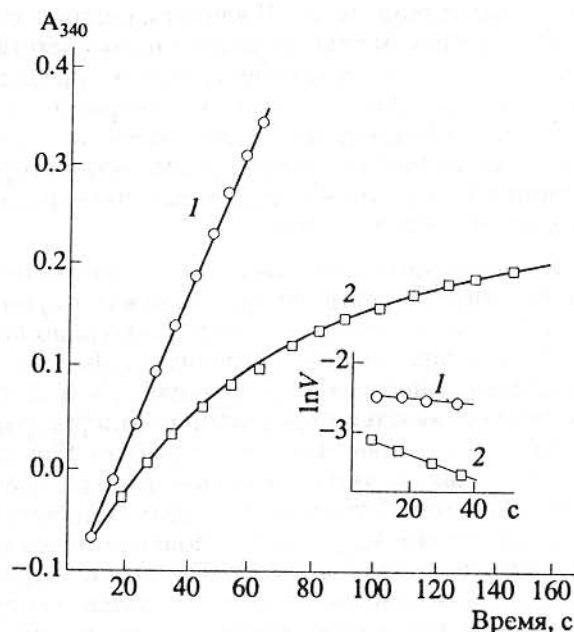


Рис. 2. Кривая продукт-время в реакции превращения пирувата в лактат, катализируемой ЛДГ из *D. salina* при pH 7.5 (1) и при pH 8.9 (2). На врезке — производные кривых 1 и 2, построенные в логарифмических координатах.

структуру более рыхлой и доступной действию протеаз. Ранее мы показали, что стабильность белков к разрушению протеазами коррелирует с их тепловой стабильностью и жесткостью структуры, определяющей заданную скорость дейтерообмена [11]. Для решения этого вопроса мы добавили ингибитор протеаз, составленный по

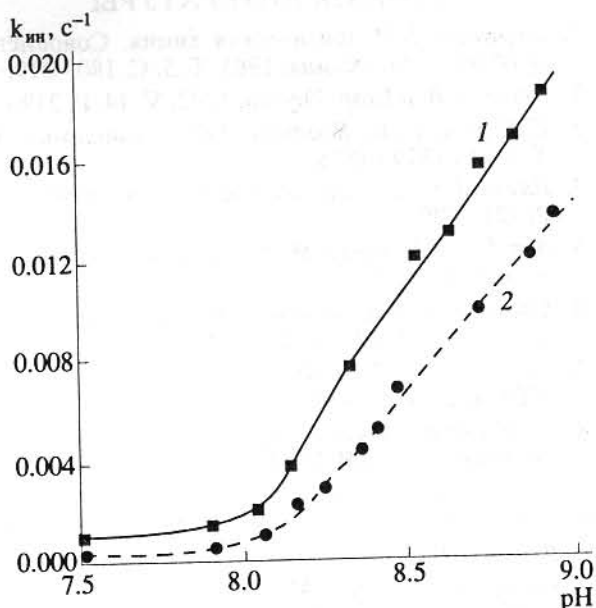


Рис. 3. Зависимость от pH констант инактивации ЛДГ из *D. salina* —  $k_{ин}$ , выраженных без глицерина (1) и с глицерином, 4.5M (2).

методу [12], в кювету с белком при pH больше 8.0. Результат оказался отрицательным, т.е. в присутствии ингибитора протеаз, равно как и в его отсутствие, инактивация фермента проходила с той же константой скорости во всей области pH. Отсюда следует, что процесс инактивации ЛДГ не связан с разрушениями протеолитическими ферментами.

Далее мы исследовали, является ли инактивация ЛДГ обратимой при возвращении pH от щелочных к исходным нейтральным значениям. Для этого после регистрации каталитической кривой продукт-время при pH 8.8, когда скорость реакции уменьшалась в 10 раз, мы изменяли pH реакционной смеси в кювете до 7.5. Скорость реакции

Таблица 1. Значения  $V_{max}$  и  $K_m$  для пирувата и НАД-Н, вычисленные по уравнению Лайнуивера-Берка, для реакции, катализируемой ЛДГ из двух видов водорослей: *D. salina* и *Chlamydomonas*

Вид водоросли	pH	Пируват		НАД-Н	
		$K_m$ , mM	$V_{max}^*$ , %	$K_m$ , mM	$V_{max}^*$ , %
<i>D. salina</i>	7.5	$0.70 \pm 0.05$	100	$0.038 \pm 0.004$	100
	8.5	$1.5 \pm 0.1$	80	$0.4 \pm 0.1$	100
<i>Chlamydomonas</i>	7.5	$0.70 \pm 0.05$	100	$0.05 \pm 0.005$	100
	9.0	$3.5 \pm 0.2$	100	$0.06 \pm 0.005$	70
	9.4	$5.0 \pm 0.2$	90	—	—
	9.7	$18 \pm 1$	80	$0.07 \pm 0.007$	60

при этом увеличивалась незначительно. Такие эксперименты по pH-удару мы проводили в начале реакции и через разные промежуточные времена после запуска реакции. Во всех случаях активность частично возрастала, но не превышала 10% ее значения при pH 7.5. Это говорит о том, что щелочная денатурация необратима.

Скорости реакции, которые приведены на рис. 1, получены экстраполяцией к нулевому моменту времени в том диапазоне pH, где реакция нелинейна. Поскольку времена щелочной инактивации фермента составляют порядка  $\tau = 1/k_{ин}$  1–5 мин в зависимости от pH (см. рис. 3), то условия квазистационарности выполняются во всем исследованном диапазоне pH (считая, что время оборота одного каталитического акта  $10^{-3}$  с [13]). Это позволяет применять в дальнейшем уравнение Михаэлиса, записанное для стационарных реакций при условии, что  $V$ , которое входит в уравнение Михаэлиса, является скоростью, полученной экстраполяцией к нулевому моменту времени.

Далее мы изучили, как зависит сродство к пирувату и НАД-Н, также  $k_{cat}$ , от pH. В табл. 1 приведены значения  $K_m$  для пирувата и НАД-Н для двух значений pH: 7.5 и 8.5. Как следует из табл. 1,  $K_m$  при pH 8.5 в 2 раза выше для пирувата и в 10 раз выше для НАД-Н, чем при pH 7.5.

$V_{max}$  остается неизменной величиной при увеличении pH до 8.5.  $V_{max}^*$ , полученное из кривых насыщения по пирувату при pH 8.5, составляет 80% от значения  $V_{max}$  при pH 7.5. Это отражает тот факт, что при pH 8.5 полного насыщения по НАД-Н не достигается. Зависимость сродства к субстратам от pH показана практически для всех ЛДГ из животных [10], бактериальных [14] и растительных [6] организмов и лежит в основе стратегии регуляции клетки к заданному уровню pH внутри клетки. Хотя величина рК для сродства пирувата несколько отличается для разных видов, но условия половины насыщения в клетке, по-видимому, строго сохраняются.

Ранее нами была подробно изучена зависимость  $K_m$  и  $V_{max}$  от pH и концентрации солей для ЛДГ из мышца свиньи и показано, что величина рК для сродства к пирувату равна 7.1, при этом  $V_{max} = const$ , т.е. не зависит от pH [3]. Для растительной клетки *D. salina* равновесие сдвинуто в сторону более щелочных значений pH, т.е. pH 8.0, причем регуляция достигается не только изменением сродства фермента к субстрату, но и сильной зависимостью от pH сродства к коферменту. Таким образом, клетка защищает себя от накопления продукта тем, что сдвиг pH в щелочную сторону (выше 8.0) снижает не только сродство к пирувату, но и сродство к НАД-Н.

Особое место занимает конформационная нестабильность фермента при pH > 8.0, приводящая к необратимой денатурации. Не исключено, что функционирование фермента в условиях высокой

концентрации глицерина (4.5 М) требует такой лабильности структуры, которая позволяла бы протекать катализу с заданной скоростью. А это означает необходимость иметь более высокие значения  $k_{cat}$  в отсутствие глицерина и, соответственно, более лабильной структуры фермента, чем для растительных клеток, не содержащих глицерин в таких количествах.

Для того чтобы проверить это предположение, мы изучили кинетику щелочной денатурации ЛДГ из *D. salina* в условиях высокой концентрации глицерина, примерно равной той, что имеется в клетке в процессе ее жизнедеятельности. На рис. 3 приведены значения константы скорости щелочной денатурации ЛДГ в присутствии 4.5 М глицерина. Как видно из рисунка, начиная с рН 8.0, константы скорости денатурации ЛДГ значительно ниже в глицерине, чем без глицерина. Принимая во внимание этот факт, можно видеть, что регуляторные особенности клетки состоят в том, что клетка синтезирует ферменты, устойчивые к высоким концентрациям глицерина, расплачиваясь за это большей нестабильностью ферментов в отсутствие глицерина. Этот эффект не наблюдается в клетках *Chlamydomonas* и в животных клетках.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Курганов Б.И. Физическая химия. Современные проблемы. М.: Химия, 1985. Т. 5. С. 180 - 219.
2. Reeves R.B. // *Resp. Physiol.* 1972. V. 14. P. 219 - 236.
3. Сабурова Е.А., Ягодина Л.О. // *Биохимия.* 1990. Т. 55. С. 1819 - 1825.
4. Raven J.A. // *Plant, Cell and Envir.* 1990. V. 13. P. 721 - 729.
5. Ben-Amotz A., Avron M. // *Trends Biochem. Sci.* 1981. V. 6. P. 267 - 299.
6. Сабурова Е.А., Симонова Н.Б., Пронина Н.А. и др. // *ДАН.* 1992. Т. 325. № 6. С. 1259 - 1264.
7. Семенов В.Е., Абдуллаев А.А. // *Физиол. раст.* 1980. Т. 27. С. 31 - 41.
8. Ладыгин В.Г. Каталог культур микроводорослей в коллекциях СССР. М., 1991. С. 152 - 173.
9. Ладыгин В.Г. // *Генетика.* 1970. Т. 6. С. 42 - 50.
10. Hoffman N.E., Hanson D. // *Plant Physiol.* 1986. V. 82. P. 664 - 670.
11. Сабурова Е.А., Маркович Д.С., Волькенштейн М.В. // *Stud. Biophys.* 1972. V. 33. P. 203.
12. Bruce B., Wynn R. // *Plant Physiol.* 1988. V. 88. P. 1201 - 1206.
13. Whitaker J.R. et al. // *Biochem. J.* 1974. V. 139. P. 677 - 684.
14. Brown A.T., Christian C.P., Eifert R.L. // *J. Bacteriol.* 1975. V. 122. P. 1126 - 1132.