

Д. С. МАРКОВИЧ, Н. В. УМРИХИНА, Р. Т. ФИН, Г. Б. КРАПИВИНСКИЙ,  
член-корреспондент АН СССР М. В. ВОЛЬКЕНШТЕЙН

### ИССЛЕДОВАНИЕ КОНФОРМАЦИОННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ АКТИВНОГО ЦЕНТРА ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ПРИ ПОМОЩИ СПЕКТРАЛЬНОЙ МЕТКИ («РЕПОРТЕРА»)

Лактатдегидрогеназа является одной из наиболее изученных дегидрогеназ (<sup>1</sup>, <sup>2</sup>). До недавнего времени, однако, отсутствовали убедительные доказательства кооперативного характера кинетики ЛДГ. Имеющиеся работы свидетельствовали либо об отсутствии кооперативности, либо о слабой положительной кооперативности по пирувату (<sup>3</sup>). В работах (<sup>4</sup>, <sup>5</sup>) обнаружена сигмоидная зависимость от концентрации пирувата при рН 8,0 и гиперболическая зависимость — при рН 8,0.

Показано, что кинетика ЛДГ (изофермент  $M_4$ ) в нейтральной среде также имеет сложный характер и может быть объяснена сочетанием положительных и отрицательных кооперативных эффектов в тетрамере (мо-

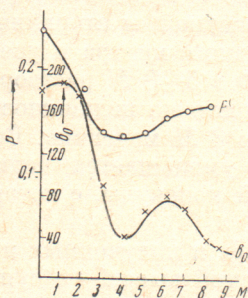


Рис. 1

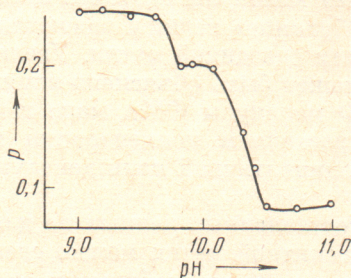


Рис. 2

дель димера — димеров). С изменением рН меняется медленная стадия в кинетике ферментативной реакции ЛДГ (<sup>6</sup>), что может быть причиной сильной зависимости характера кинетических кривых от рН. Другой возможной причиной является зависимость четвертичной структуры ЛДГ от рН. Доказано, что в нейтральной среде ЛДГ не диссоциирует на субъединицы при разбавлении (<sup>2</sup>, <sup>7</sup>), в щелочной среде диссоциация, видимо происходит (<sup>8</sup>). Диссоциация связана с инактивацией фермента и конформационными изменениями субъединиц. Для исследования конформационной стабильности и взаимодействия субъединиц в ЛДГ применены спектральные метки — ртутные производные флуоресцеина. В данной работе представлены результаты исследования конформационной стабильности ЛДГ по изменениям поляризации флуоресценции (п.ф.) флуоресцеин меркурий ацетата (ФМА), связанного с SH-группой активного центра (1 молекула ФМА на тетрамер ЛДГ).

Рис. 2. Зависимость п.ф. от рН. Концентрация ЛДГ  $10^{-6}$  —  $5 \cdot 10^{-7}$  М, время инкубации 2,5 часа,  $20^\circ\text{C}$

Рис. 2. Зависимость п.ф. от рН. Концентрация ЛДГ  $10^{-6}$  —  $5 \cdot 10^{-7}$  М, время инкубации 2,5 часа,  $20^\circ\text{C}$

Лактатдегидрогеназу выделяли из скелетных мышц свиньи по методу (9). Характеристика препарата дана ранее (10). На рис. 1 представлены кривые изотермического разворачивания ЛДГ в мочеvine. ПФ уменьшается уже в 1 M растворе мочеvины, достигает минимальных значений (11%) в 4 M мочеvине, далее в 5—8 M мочеvине возрастает до 15%. Известно, что диссоциация ЛДГ на субъединицы происходит лишь при высоких концентрациях мочеvины и, следовательно, не может быть причиной изменений ПФ при малых концентрациях (11). Кроме того, время жизни возбужденного состояния,  $\tau$ , ФМА равно 5 нсек,  $\tau$  ФМА в комплексе с ЛДГ — меньше 1 нсек. Кривые изотермического разворачивания, полученные методами дисперсии оптического вращения (д.о.в.) и п.ф. не совпадают при малых концентрациях мочеvины. В 1—2 M мочеvине (см. рис. 1) константа  $b_0$  уравнения Моффитта не изменяется. Известно, однако, что изофермент  $M_i$  в 1—1,5 M мочеvине полностью инактивируется (12). Данные ПФ, по-видимому, отражают те большие конформационные изменения в активном центре ЛДГ, которые достаточны для потери активности.

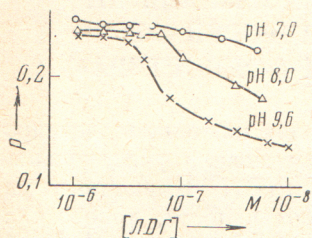


Рис. 3. Концентрационная зависимость ПФ растворов ЛДГ при различных рН

Для ряда белков доказано, что их изотермическое разворачивание в мочеvине протекает через ряд промежуточных, частично развернутых конформаций (13). Предполагается, что при малых концентрациях мочеvины происходит «набухание» молекулы ЛДГ без заметных изменений ее вторичной структуры. «Набухание» ведет к разрыхлению активного центра и увеличению подвижности связанной метки. Увеличение ПФ в 5—8 M растворах мочеvины не может быть объяснено влиянием вязкости на подвижность самой метки. ПФ молекулы ФМА мало изменяется в 8 M мочеvине. Возможно, что с возрастанием концентрации мочеvины уменьшается подвижность участка полипептидной цепи денатурированной молекулы, с которым связан ФМА.

Из сопоставленных данных по д.о.в. (14), п.ф. и полученных при помощи парамагнитной метки можно сделать и другой вывод — о существовании промежуточного стабильного состояния частично развернутой молекулы в 5—6 M мочеvине, возможно, за счет переориентации субъединиц в тетрамере.

На рис. 2 приведена зависимость п.ф. от рН для комплекса ЛДГ — ФМА. Как видно, п.ф. уменьшается в интервале рН от 9,6 до 10,5. В этом же интервале рН происходит конформационный переход по данным д.о.в. и дифференциальных спектров поглощения (10, 15). Кривая денатурации по данным п.ф. является ступенчатой с плато при рН 9,8—10,0. Возможно, что при рН 9,8—10,0 имеется стабильная конформация ЛДГ (первая — в нейтральной среде) с максимальной активностью по отношению к лактату.

В  $10^{-6}$ — $10^{-7}$  M растворах ЛДГ при  $\text{pH} \geq 9$ , по-видимому, происходит диссоциация тетрамера (8). На рис. 3 приведены результаты исследования концентрационной зависимости п.ф. при различных рН. При рН 7,0 п.ф. при разбавлении уменьшается незначительно. В этих же условиях Андерсон (7) не обнаружила изменений п.ф. 1-диметилампинонафталин-5-сульфонилхлорида, связанного с  $\text{NH}_2$  группой ЛДГ. Данные об изменениях активности ЛДГ при разбавлении в нейтральной среде противоречивы (7, 16). Значительных конформационных изменений в этих условиях не отмечается (8). При рН 8,0—9,6 п.ф. значительно уменьшается с разбавлением фермента (рис. 3). Эти изменения при каждом разбавлении заканчиваются полностью за те 15—20 сек., которые необходимы для разведения и измерений. Введение метки в молекулу не является причиной кон-

центрационной диссоциации. Добавление немеченой ЛДГ в разбавленный раствор меченого фермента при рН 8,0 ведет к увеличению п.ф. до значений, присущих полностью меченой ЛДГ в этих же концентрациях. После увеличения концентрации ЛДГ п.ф. возрастает в течение 10—15 мин. Из этого опыта следует также, что изменения п.ф. с разведением ЛДГ обратимы.

Итак, показано, что п.ф. метки (ФМА) в активном центре ЛДГ является чувствительным индикатором на локальные конформационные изменения. В областях рН оптимумов активности ЛДГ существуют различные конформации фермента. С уменьшением концентрации ЛДГ изменяется окружение метки в активном центре; при рН  $> 8$  эти изменения выражены сильнее, чем в нейтральной среде.

Институт биологической физики  
Академии наук СССР  
Пушино-на-Оке

Поступило  
14 VII 1970

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> M. Adams et al., *J. Molec. Biol.*, **41**, 159 (1969). <sup>2</sup> A. Presce et al., *J. Biol. Chem.*, **244**, 2891, (1969). <sup>3</sup> P. Fritz, *Science*, **156**, 82 (1967). <sup>4</sup> P. Hochachka, *Arch. Biochim. Biophys.*, **111**, 96 (1965). <sup>5</sup> В. Л. Шпицберг, А. И. Горюнов, *ДАН*, **189**, 5, 1132 (1969). <sup>6</sup> R. Cuddihy, *Nature*, **220**, 1091 (1968). <sup>7</sup> S. Anderson, *Biochemistry*, **8**, 1394 (1969). <sup>8</sup> A. Yoshida, *Biochim. Biophys. Acta*, **147**, 39 (1967). <sup>9</sup> G. Jecsei, *Acta physiol. Hung.*, **20**, 339 (1961). <sup>10</sup> J. Bolotina et al., *Biochim. Biophys. Acta*, **132**, 260 (1967). <sup>11</sup> R. Jaenicke, *Biochim. Biophys. Acta*, **60**, 305 (1962). <sup>12</sup> A. Continen, S. Lindy, *Nature*, **208**, № 5012 (1965). <sup>13</sup> Б. Атанасов, *Молек. биол.*, **3**, 51 (1970). <sup>14</sup> Д. Маркович, Кандидатская диссертация, г. Пушино, 1967. <sup>15</sup> P. Elödi, *Biochim. Biophys. Acta*, **110**, 484 (1965). <sup>16</sup> P. Bernfeld, *Arch. Biochim. Biophys.*, **111**, 31 (1965).