

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

КОНФОРМЕРЫ ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ

Ранее нами было показано, что флуоресцеинмеркурацетат (ФМА) является чувствительным «репортером» для исследований конформационных изменений лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и *D*-глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ГАФД) (1, 2). ФМА взаимодействует с SH-группой А в активном центре в ЛДГ и SH₁₄₉ в активном центре ГАФД. Связывание «репортера» вызывает изменения его спектров поглощения, спектров и поляризации флуоресценции. При pH > 7 в интервале концентраций ЛДГ от 5 · 10⁻⁷ до 10⁻⁵ M происходит диссоциация тетрамера, которая приводит к

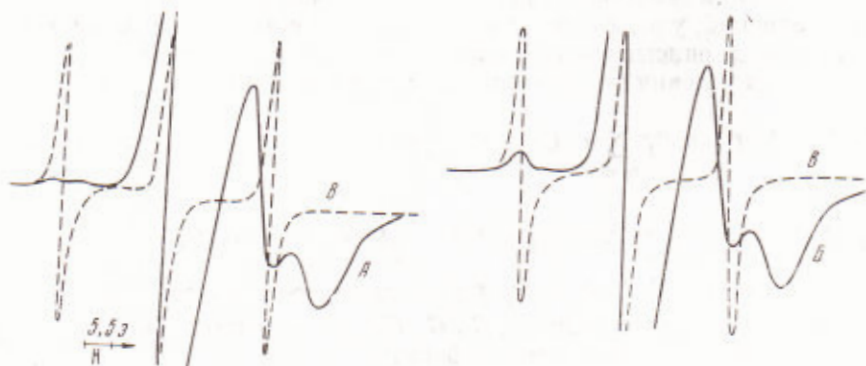
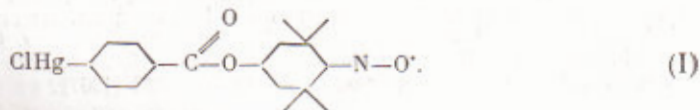


Рис. 1. Спектры э.п.р. парамагнитной метки I в комплексе с ЛДГ при pH 7,0 (А), при pH 8,0 (В) и в растворе (В)

увеличению подвижности молекулы «репортера», расположенной поблизости от контактных площадок субъединиц (1). По нашим представлениям, в большинстве случаев диссоциация тетрамера является следствием конформационных изменений в субъединицах; эти изменения могут иметь локальный характер, но затрагивают области контактных площадок. Как известно из литературы, в интервале pH 7—8 гидродинамические и оптические параметры молекулы ЛДГ изменяются незначительно (3, 4). Поскольку взаимодействия субъединиц тетрамера в растворе могут иметь динамический характер, то мы исследовали в этом интервале pH внутримолекулярную подвижность (локальную «микровязкость») в активном центре ЛДГ при помощи парамагнитной метки I:



Выделение ЛДГ из мышц свиньи и условия инкубации с меткой I описаны ранее (2).

По нашим данным, I взаимодействует с SH-группой активного центра ЛДГ и вызывает полное ингибирование фермента при соотношениях $I/\text{ЛДГ} = 4/1$ (2).

Как видно из рис. 1, связывание I в активном центре ЛДГ при pH 7 и 8 приводит к сильной иммобилизации радикала. Это проявляется в значительном уширении компонент спектра, резко выраженной анизотропии сигнала (компонента с $m_N = -1$ в области высоких полей едва заметна на спектре при pH 7, и для вычислений частот вращения ν прибегали к накоплению сигнала), появлению новой уширенной компоненты в области низких полей. Время корреляции изотропного вращательного движения вычисляли по формуле (3)

$$\tau_R = -8,4(1 - \sqrt{I_{+1}/I_{-1}}) \Delta H_{\max(+1)} \cdot 10^{-10} \text{ сек.},$$

где $\Delta H_{\max(+1)}$ — ширина линии между точками максимального наклона компоненты с $m_N = +1$; $I_{\pm 1}$ — интенсивности компонент с $m_N = +1$, лежащих в области низких и высоких полей соответственно.

Частота вращения радикала $\nu_R = 1/\tau_R$. На рис. 2 приведены температурные зависимости ν для pH 7 и 8. Термодинамические параметры вычислялись согласно работе (3). Полученные данные приведены в табл. 1.

Как видно из рис. 2 и табл. 1, температурные зависимости ν при pH 7 и 8 резко различаются. При pH 7 метка сильно «заторможена» и находится в окружении, жесткость которого слабо зависит от температуры. Из табл. 1 видно, что низкая подвижность радикала при pH 7 определяется энтропийным фактором. При pH 8 метка более подвижна, ее окружение соответствует умеренно вязкой среде. Энергетический барьер вращения выше, но это компенсируется большими положительными значениями ΔS .

Обнаруженные изменения в подвижности I в интервале pH 7—8 проявляются при температурах, далеких от области тепловой денатурации ЛДГ. При $\text{pH} < 7$ и $\text{pH} > 8$ ν изменяется незначительно (в пределах стабильности молекулы, pH 5—9).

Косвенным подтверждением наших результатов можно считать работу Вессела и соавторов (6), которые показали, что в интервале pH 7—8 происходят резкие изменения константы скорости тепловой инактивации ЛДГ (при 53°). Эти изменения, по Весселу, сильнее выражены в изоферменте M_1 , чем в M_2 . Известно также, что примерно в этом же интервале pH происходят изменения структурных и функциональных свойств преимущественно изофермента M_1 (табл. 2).

Таким образом, при отсутствии существенных конформационных изменений ЛДГ в интервале pH 7—8 происходят изменения стабильности и

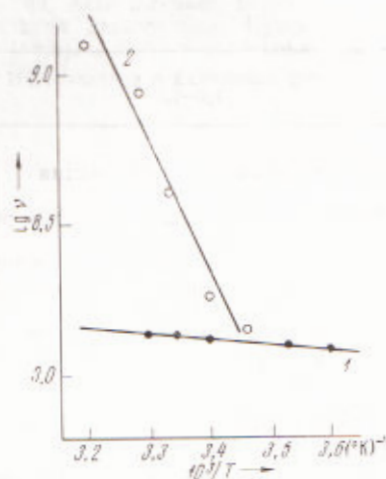


Рис. 2. Зависимость частоты вращения ν парамагнитной метки в активном центре ЛДГ от температуры. 1 — pH 7,0, 2 — pH 8,0

Таблица 1

Термодинамические параметры активации вращения парамагнитной метки I

pH	ν_{20° , сек ⁻¹	ΔH^* , ккал/моль	$\Delta S_{20^\circ}^*$, в. е.
7,0	$8 \cdot 10^7$	1,5	-16
8,0	$1,2 \cdot 10^8$	15	+40

внутримолекулярной подвижности субъединиц, которые сопровождаются изменениями функции фермента.

Каков механизм этих изменений? Известно, что в этом интервале рН ионизируются преимущественно имидазольные группы гистидина. Из анализа аминокислотного состава изоферментов из различных тканей и видов животных следует, что изоферменты M_1 отличаются от H_1 заменой остатков глютаминной кислоты (H_1) на треонин и гистидин (M_1). Следовательно, изменения рН в области ионизации гистидина (\sim рН 7–7,5) вызовут большие изменения электростатической энергии глобулы именно в изоферменте M_1 .

Таблица 2

Характер изменений в интервале рН 7,0–8,0	M_1	H_1
Концентрационная диссоциация	По-видимому, имеется (7-8)	Не обнаружена (9-11)
Изменения в кинетике тепловой денатурации (9)	Большие	Менее выражены
Переход от некооперативной кинетики к кооперативной (по пирувату)	Доказан (12, 13)	Не обнаружен (12)
Зависимость ферментативной активности от рН	Сильно выраженная (13)	Незначительная

Мы предлагаем модель тетрамера ЛДГ, включающую два конформера (оба в тетрамерном состоянии) с жесткими (рН 7) и подвижными (рН 8) контактами субъединиц. Всякого рода взаимодействия субъединиц в тетрамерной структуре можно разделить на две группы: 1) эффекты взаимной стабилизации субъединиц по отношению к денатурирующим агентам, а также стабилизации кофакторами и субстратами (15-17); 2) кооперативные эффекты, связанные с функцией фермента и выражающиеся в осуществлении индуцированного соответствия в активном центре и трансляции конформационной «волны» с одного центра на соседний, что в конечном счете вызывает различные отклонения в кинетике ферментативной реакции от уравнения Михаэлиса. Эффекты первого рода хорошо выражены при жестких контактах субъединиц. Эффекты второго рода появляются при определенной лабильности контактов.

Ионизация гистидиновых остатков может вызывать увеличение лабильности контактов как непосредственно, так и косвенным образом, через изменения общей лабильности (подвижности) субъединиц. Изменения равновесия конформеров ЛДГ при физиологических условиях могут быть вызваны как локальными сдвигами рН в тканях, так и влиянием различных метаболитов.

Возможно, что различная стабильность конформеров имеет значение и для регуляции катаболизма ЛДГ, существование которой предполагает Вессел (6), исходя из общей гипотезы о регуляции распада белков, выдвинутой Шимке (18).

Институт биологической физики
Академии наук СССР
Пущино-ла-Оке

Поступило
22 III 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Д. С. Маркович, Н. В. Умрихина и др., ДАН, **194**, 1365 (1970). ² Д. С. Маркович, Н. В. Умрихина, М. В. Волькенштейн, Молек. биол., **5**, 51 (1971). ³ R. Jaenicke, S. Knof, Europ. J. Biochem., **4**, 157 (1968). ⁴ S. Libor, P. Elodi, Z. Nagy, Biochim. et biophys. acta, **110**, 484 (1965). ⁵ Г. И. Лихтенштейн, П. Х. Бободжанов, Биофизика, **13**, 757 (1968). ⁶ E. S. Vessel, K. L. Yielding, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., **56**, 1317 (1966). ⁷ A. Yoshida, Biochim. et biophys. acta, **147**, 39 (1967). ⁸ Б. И. Курганов, С. Суриц, Н. Сугрובה, Мол. биол., **2**, 180 (1968). ⁹ S. Anderson, Biochemistry, **8**, 1394 (1969). ¹⁰ A. Pesce et al., J. Biol. Chem., **239**, 1753 (1964). ¹¹ E. Apella, Brookhaven. Sympos. Biol., **17**, 151 (1964). ¹² P. Fritz, Science, **156**, 82 (1967). ¹³ P. W. Hochachka, Arch. Biochem. and Biophys., **111**, 96 (1965). ¹⁴ A. Pesce, T. P. Fondy et al., J. Biol. Chem., **242**, 2151 (1967). ¹⁵ M. G. Khan, J. Siidi, Acta biochem. biophys. Hung., **3**, 409 (1968). ¹⁶ Д. С. Маркович, Кандидатская диссертация, Пуцино, 1967. ¹⁷ G. D. Sabato, M. Ottesen, Biochem., **4**, 422 (1965). ¹⁸ K. T. Schimke, E. W. Sweeney, C. M. Berlin, J. Biol. Chem., **240**, 322 (1965).