

УДК 577.322 : 57.043

© Г. В. Тарадина, О. И. Доценко

ОЛИГОМЕРНЫЕ ИНТЕРМЕДИАТЫ КАТАЛАЗЫ В РАСТВОРЕ ПРИ ДЕЙСТВИИ НИЗКОЧАСТОТНОЙ ВИБРАЦИИ

Донецкий национальный университет; 83050, г. Донецк, ул. Щорса, 46
e-mail: galyabio@mail.ru

Тарадина Г. В., Доценко О. И. Олигомерные интермедиаты каталазы в растворе при действии низкочастотной вибрации. – СФ-исследование растворов каталазы, подвергаемых действию вибрации в диапазоне частот 8-32 Гц, выявило, что появлению олигомерных интермедиатов способствуют денатурационные изменения в области активного центра фермента. Методом гель-электрофореза в неденатурирующих условиях показано, что при действии вибрации в растворах каталазы возможно образование как диссоциированных форм, так и макромолекулярных комплексов. Соотношение между интермедиатами, динамически сосуществующими в растворе, зависит от условий эксперимента. Показано стабилизирующее действие солей, присутствующих в растворе, на олигомерные интермедиаты каталазы. Установлено, что окисление аминокислотных остатков при действии вибрации интервала частот 24-32 Гц может существенно влиять на процессы диссоциации каталазы на субъединицы. Окислительная модификация каталазы идет в направлении: гем → ароматические аминокислотные остатки → вторичная структура и определяется гибкостью активного центра фермента.

Ключевые слова: каталаза печени быка, низкочастотная вибрация, UV-спектры поглощения, нативный гель-электрофорез, ассоциированное состояние, диссоциация.

Введение

В настоящее время влияние низкочастотной вибрации как постоянно действующего фактора окружающей среды является актуальной проблемой. Особый интерес представляют исследования по воздействию низкочастотной вибрации на организм человека.

Известно, что в условиях хронического действия на человека механических колебаний возникает окислительный стресс, который сопровождается накоплением в тканях свободных радикалов. Одним из ферментов, выполняющих антиоксидантную функцию путем разложения перекиси водорода – побочного продукта метаболизма и источника свободных радикалов, является каталаза ($H_2O_2:H_2O_2$ оксиредуктаза КФ 1.11.1.6). Молекула каталазы, как и других белков, может легко изменять свои свойства под действием различных физико-химических факторов. С другой стороны, каталаза может быть удобным объектом исследования, поскольку известны уровни ее структурной организации и те важные функции, которые она выполняет в организме.

Каталазы, хотя и синтезируются от единственных генов и состоят из подъединиц только одного типа, существуют в биологических системах в гетерогенной форме относительно их конформационных и ассоциированных состояний. Эта разнородность не имеет генетического происхождения, а скорее отражает неустойчивость олигомерного гемопротейна. Ранее нами было выявлено достоверное снижение активности каталазы в растворе под действием низкочастотных механических колебаний [1, 2]. Степень инактивации каталазы зависела от условий эксперимента и достигала 17-78% по отношению к контролю. Целью данной работы было показать, что снижение активности фермента обусловлено конформационными перестройками в структуре молекулы.

Материалы и методы исследования

При проведении исследований использовали растворы каталазы печени быка (КФ 1.11.1.6, Sigma, США) в Na-фосфатном буфере с pH 7,4, содержащем 0,15 М NaCl (Скат = $1,0 \cdot 10^{-6}$ моль/л). Концентрацию каталазы определяли спектрофотометрически, используя при расчетах коэффициент молярной экстинкции $\epsilon_{405} = 324000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Растворы фермента подвергали действию трехчасовой вибрации в диапазоне частот 8-32 Гц с шагом 4 Гц при помощи разработанного на кафедре биофизики ДонНУ вибростенда, состоящего из генератора низкочастотных сигналов синусоидальной формы, усилителя и электромеханического преобразователя сигналов, совершающего колебания в вертикальной плоскости с заданной частотой и амплитудой. Амплитуда входного сигнала составляла

0,9±0,08 мм. Результирующую амплитуду сигнала контролировали с помощью осциллографа, подключенного к электромеханическому преобразователю сигналов. В качестве контроля использовали раствор фермента до воздействия фактора.

Спектральные свойства каталазы изучали в диапазоне длин волн 220-700 нм. Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре S108UV в стандартных кварцевых кюветах (длина оптического пути 1 см).

Для выявления форм каталазы, присутствующих в растворе до и после воздействия вибрации, применяли электрофорез в 8%-ном полиакриламидном геле в неденатурирующих условиях [3, 4], проводимый в камере для вертикального электрофореза (Helicon, Россия). Для определения молекулярного веса белков использовали маркеры SM0671 (Fermentas, Литва). Результаты электрофореза анализировали с использованием программы «Quantity One» в системе гель-документации Gel Doc XR (Bio-Rad, USA).

Степень окислительной модификации белков оценивали по содержанию в них карбонильных групп. Метод основан на реакции взаимодействия окисленных аминокислотных остатков белка с 2,4-динитрофенилгидразином (2,4-ДНФГ) с образованием альдегид- и кетондинитрофенилгидразонов, оптическую плотность которых регистрировали спектрофотометрически при 370 нм. Содержание карбонильных групп определяли с использованием коэффициента экстинкции 22000 М⁻¹·см⁻¹ [5].

Результаты и обсуждение

Для выявления возможных конформационных изменений в молекуле каталазы под действием низкочастотных механических колебаний в ходе эксперимента регистрировали спектры поглощения белка в видимой и ультрафиолетовой области спектра. Анализ спектров поглощения показал, что эффект воздействия неоднозначен и зависит от частоты и времени действия вибрации. Так, вибрация растворов каталазы в диапазоне частот 8-12 Гц приводила к снижению интенсивности спектров поглощения фермента во всем исследуемом диапазоне длин волн (рис. 1, а-в), при этом степень снижения интенсивности поглощения коррелировала с длительностью вибрационного воздействия.

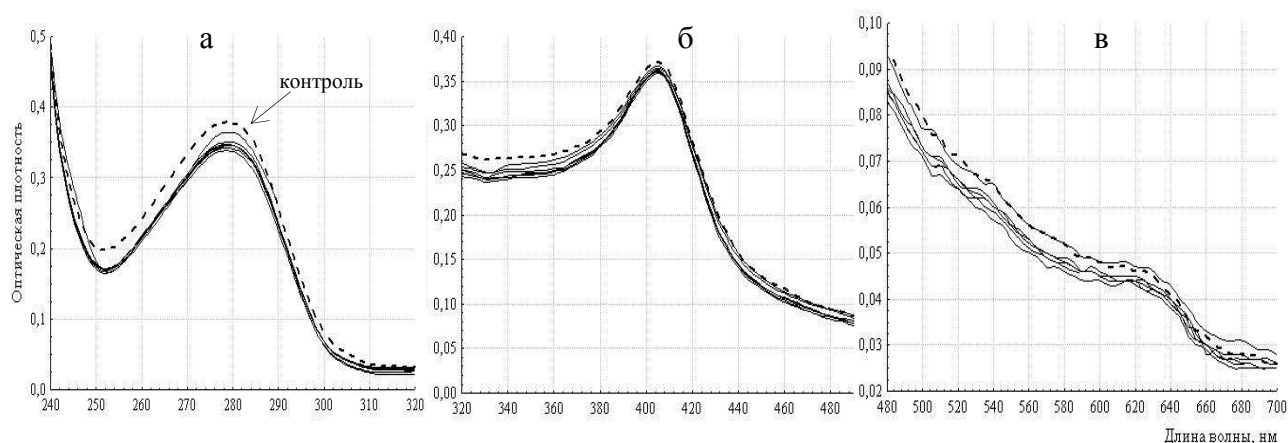


Рис. 1. Спектры поглощения растворов каталазы до и после воздействия вибрации с частотой 12 Гц в ультрафиолетовой (а) и видимой (б – 320-480 нм; в – 480-700 нм) области.

Полоса в УФ области обусловлена способностью тирозина, триптофана и в меньшей степени фенилаланина поглощать свет в этой области спектра. Наблюдаемые изменения свидетельствуют о перестройке в структуре глобулы и могут быть связаны с изменением содержания ароматических аминокислотных остатков в составе белка или их микроокружения. В области 480-750 нм для фермента характерны три максимума при 504, 538 и 640 нм. Полосы 504 и 640 нм соответствуют высокоспиновым π - $d\pi$ переходам между порфириновым кольцом и атомом железа, пик 538 нм – π - π^* переходам в гемовой группе [6]. Уменьшение интенсивности спектров в диапазоне длин волн 480-700 нм (рис. 1, в)

свидетельствует также об ослаблении связи гема с Tyr³⁵⁷ и аминокептидной цепью, расположенной с дистальной стороны [7], что может происходить при потере нативности фермента в результате разворачивания α -спиралей и ослабления внутренних водородных связей между пептидными карбоксилатами и фенильными группами тирозиновых остатков. В этом случае ионы Na⁺, находящиеся в растворе, способны проникать в гидрофобные области белка и связываться с карбоксильными группами, что приведет к эффективному уменьшению поверхностного заряда белка. Характер взаимодействия макромолекул белков при этом будет определяться уже не кулоновскими, а диполь-дипольными силами. Энергия диполь-дипольного взаимодействия может превышать тепловую энергию kT почти в 100 раз, поэтому при сближении на предельно малые расстояния белковые молекулы могут образовывать макромолекулярный комплекс – дипольный кластер [8]. Гипохромный эффект в полосе Soret (рис. 1, б) [9] может свидетельствовать об усилении межмолекулярных взаимодействий (в том числе и взаимодействий между хромофорами), что проявляется при образовании молекулярных ассоциатов.

Через 120 минут действия вибрации с частотой 16 Гц в растворах каталазы наблюдали появление осадка, в связи с чем анализ спектров поглощения для этой серии экспериментов представляет определенные трудности. Денатурированный тетрамер каталазы, стабилизированный солями, имеет большое количество экспонированных гидрофобных кластеров [10], что и становится причиной его агрегации при данных условиях эксперимента.

Для растворов, подвергаемых воздействию вибрации с частотой 20 Гц, наблюдали увеличение интенсивности спектров поглощения во всем диапазоне длин волн (рис. 2, а-в) после первого часа эксперимента. Если в течение первого часа эксперимента наблюдалось некоторое снижение поглощения в области полосы Soret, то последующее воздействие привело к росту интенсивности и расширению спектров поглощения каталазы в диапазоне 380-420 нм (рис. 2, б) без какого-либо смещения максимума поглощения.

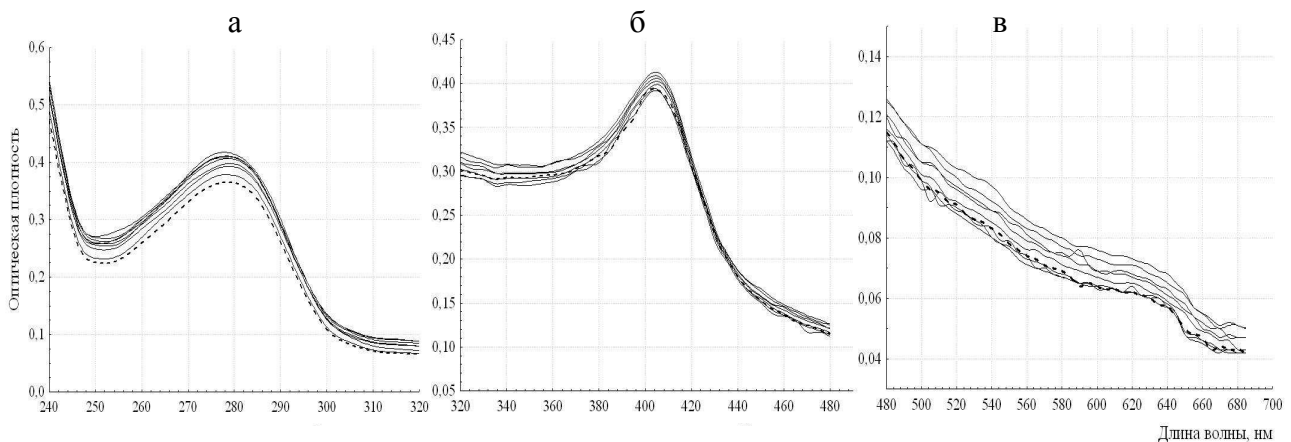


Рис. 2. Спектры поглощения растворов каталазы до и после воздействия вибрации с частотой 20 Гц в ультрафиолетовой (а) и видимой (б – 320-480 нм; в – 480-700 нм) области.

Подобное изменение спектров поглощения для каталазы описано в [10], где были показаны диссоциация тетрамерной формы фермента до димерной и наличие равновесия между интермедиатами, в значительной степени определяемого составом среды и концентрацией каталазы. Солевая среда способствует восстановлению и поддержанию нативности димерной формы фермента.

Изменение интенсивности спектров поглощения растворов каталазы, подвергавшихся действию вибрации с частотами 24, 28 и 32 Гц, не имело монотонного характера. Так, интенсивность поглощения в УФ-части спектра увеличивалась (вибрация с частотой 28 Гц), либо ее изменение было немонотонным (24 и 32 Гц), что, возможно, объясняется сосуществованием в растворе нескольких форм каталазы (ассоциированных, тетрамерных, диссоциированных) и соль-индуцированным рефолдингом фермента (рис. 3, а). Такой же

характер изменения поглощения в области полосы Соре и в области 480-700 нм указывает на крайне гетерогенный состав раствора каталазы, изменяющийся в процессе действия вибрации.

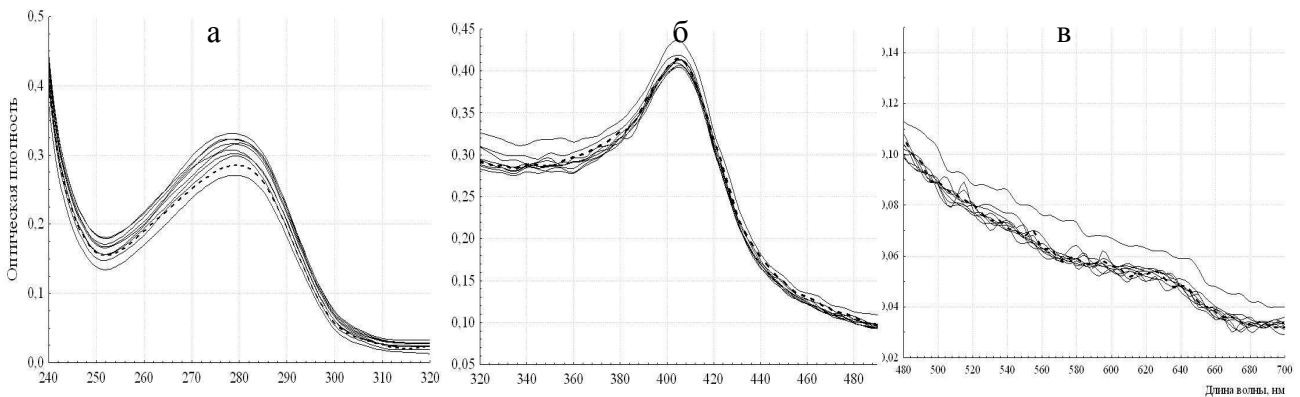


Рис. 3. Спектры поглощения растворов каталазы до и после воздействия вибрации с частотой 28 Гц в ультрафиолетовой (а) и видимой (б – 320-480 нм; в – 480-700 нм) области.

Данные спектрофотометрических исследований согласуются с результатами, полученными методом электрофоретического разделения растворов фермента. При вибрации каталазы в диапазоне частот 8-16 Гц было выявлено присутствие в растворе тетрамерных форм каталазы (их количество снижалось) и ассоциированных форм с молекулярной массой порядка 360 и 480 кДа, концентрация которых увеличивалась по мере воздействия фактора (рис. 4, а).

При анализе электрофореграмм растворов каталазы, подвергавшихся вибрации с частотой 20 Гц, было выявлено наличие ассоциированных, тетрамерных форм фермента, а через час воздействия фактора появлялось незначительное количество диссоциированных (димерных) форм фермента (рис. 4, б). Для растворов, подвергаемых вибрации с частотами 24, 28 и 32 Гц, было выявлено присутствие тетрамеров (их количество незначительно снижалось в ходе трехчасовой вибрации), а также в меньшей степени – димеров и мономеров, содержание которых увеличивалось к окончанию эксперимента. На электрофореграммах были выявлены зоны, соответствующие молекулярной массе частиц 240, 120 и 60 кДа (рис. 4, в).

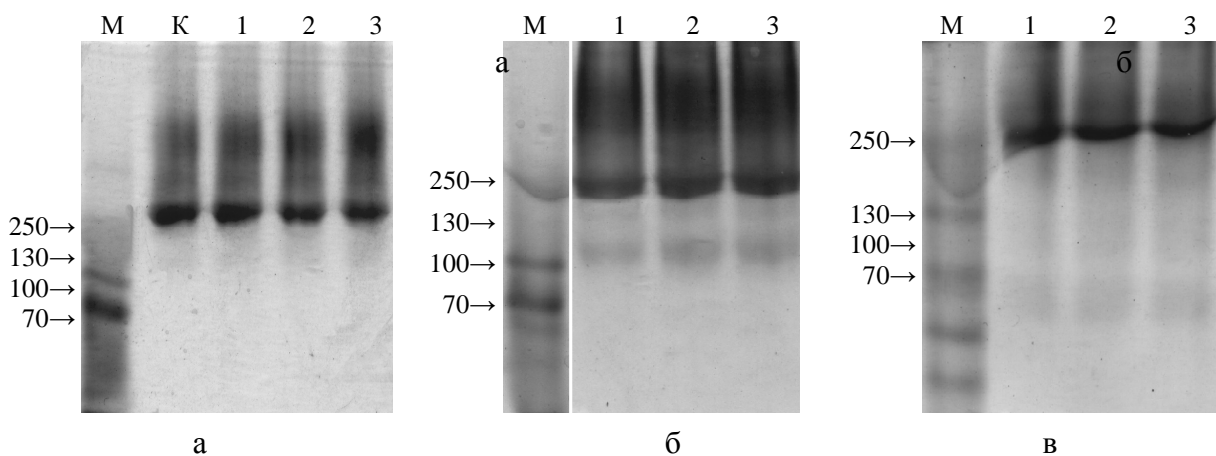


Рис. 4. Электрофореграммы растворов фермента каталазы при воздействии вибрации с частотой 12 (а), 20 (б) и 28 (в) Гц. Время вибрации: 1 – 1 час; 2 – 2 часа; 3 – 3 часа; К – контроль; М – маркер молекулярного веса (кДа).

Суммуя данні СФ- і електрофоретических ісследованій, можна заклучить, що появлению олигомерных интермедиатов способствують денатурацiонные изменения в области активного центра фермента. Полученные данные хорошо согласуются с теорией гибкости активного центра ферментов [11], согласно которой активный центр фермента сформирован относительно слабыми молекулярными взаимодействиями и, следовательно, может быть конформационно более гибким, чем остальная часть неповрежденного фермента.

Ранее нами было предположено, что при воздействии на растворы низкоинтенсивных механических колебаний возможно образование активных форм кислорода, способных рекомбинировать с образованием радикалов. В пользу данной гипотезы свидетельствовала передача эффекта через предварительно «отвибрированный» растворитель; отсутствие снижения активности фермента в бескислородных растворах; уменьшение степени вибрационной инактивации в присутствии ловушек НО·-радикалов, снижающих инактивацию фермента [1, 2]. Приведенные факты дают основание предположить причинную связь между потерей ферментативной активности каталазы при действии низкочастотных механических колебаний и появлением АФК и их производных в растворе.

Анализ характера изменения содержания карбонильных групп в составе каталазы до и после действия вибрации показал, что на процессы потери нативности и последующую диссоциацию до димерной и мономерной форм может оказывать влияние окислительная модификация аминокислотных остатков. На рис. 5 показано изменение содержания карбонильных групп в составе каталазы в процессе трехчасовой вибрации.

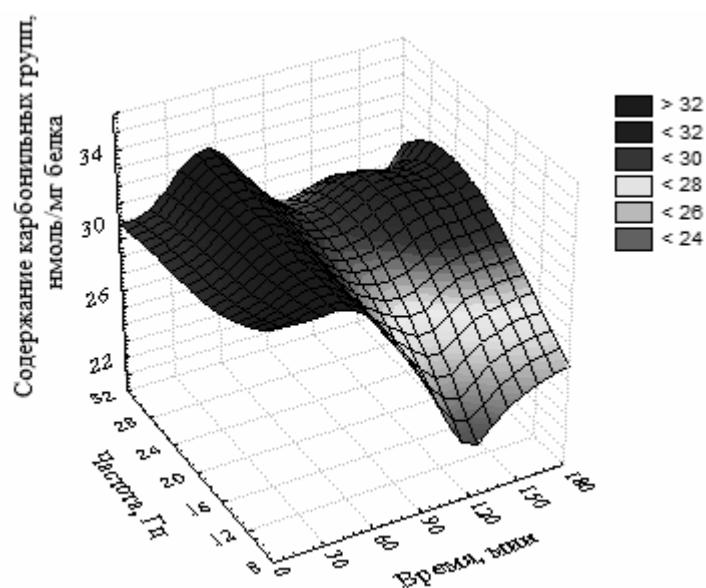


Рис. 5. Изменение содержания карбонильных групп в растворах каталазы в зависимости от частоты и длительности вибрации.

В интервале частот 8-16 Гц содержание карбонильных групп в пробе удерживалось на исходном уровне в течение первого часа воздействия и затем резко снижалось. Причиной снижения регистрируемых карбонильных групп в составе белка является образование агрегированной формы каталазы, в результате чего доступность карбонильных групп для определения затруднена. В интервале частот 24-32 Гц содержание карбонильных групп возрастало в течение первого часа воздействия, а затем снижалось до уровня контроля. Учитывая экспериментальные данные, описанные выше, незначительный прирост карбонильных групп и строение самого фермента, можно предположить участие гемового железа в процессах окислительной модификации. По-видимому, процесс окислительной модификации каталазы идет в направлении: гем → ароматические аминокислотные остатки → вторичная структура. В этом случае окисление аминокислотных остатков может существенно влиять на процессы диссоциации каталазы на субъединицы.

Выводы

Анализ спектров поглощения растворов каталазы, подвергаемых действию вибрации в диапазоне частот 8-32 Гц, показал, что появлению олигомерных интермедиатов способствуют денатурационные изменения в области активного центра фермента.

Точное поведение данного белка при данном рН – сложное взаимодействие между множеством стабилизационных и дестабилизационных сил, некоторые из которых чувствительны к окружающей среде.

Методом гель-электрофореза в неденатурирующих условиях показана возможность образования в растворах каталазы в процессе действия вибрационного фактора как диссоциированных форм каталазы, так и макромолекулярных комплексов. Соотношение между интермедиатами, динамически сосуществующими в растворе, зависит от условий эксперимента.

Соли, присутствующие в растворе, затрагивают, главным образом, электростатические и гидрофобные взаимодействия в молекулах белка, стабилизируя олигомерные интермедиаты каталазы.

Окисление аминокислотных остатков, обнаруживаемое при действии вибрации интервала частот 24-32 Гц, может существенно влиять на процессы диссоциации каталазы на субъединицы. Процесс окислительной модификации каталазы идет в направлении: гем → ароматические аминокислотные остатки → вторичная структура и определяется гибкостью активного центра фермента.

Список литературы

1. Тарадина Г. В. Кинетическое исследование инактивации фермента каталазы под действием низкочастотной вибрации / Г. В. Тарадина, О. И. Доценко // Проблемы экологии и охраны природы техногенного региона. – Донецк: ДонНУ, 2006. – Вып. 6. – С. 251–256.
2. Тарадина Г. В. Исследование влияния низкочастотной вибрации на инактивацию растворов фермента каталазы / Г. В. Тарадина, О. И. Доценко // Проблемы экологии и охраны природы техногенного региона. – Донецк: ДонНУ, 2007. – Вып. 7. – С. 255–262.
3. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U. K. Laemmli // Nature. – 1970. – V. 227. – P. 680–685.
4. Niepmann M. Discontinuous native protein gel electrophoresis: pros and cons / M. Niepmann // Expert Rev Proteomics. – 2007. – V. 4, № 3. – P. 355–361.
5. Луцак В. І. Показники оксидативного стресу. 1. Тіобарбітуратні продукти і карбонільні групи білків / В. І. Луцак, Т.В. Багнюкова, О.В. Луцак // Укр. біохім. журн. – 2004. – Т. 76, № 3. – С. 136–141.
6. Bartoszek M. The study of pH influence on bovine liver catalase by means of UV-VIS spectroscopy and spin labelling method / M. Bartoszek, W. W. Sulkowski // Polish J. of Environ. Stud. – 2006. – V. 15, № 4A. – P. 41–43.
7. Rai J. Tyrosine–heme ligation in heme–peptide complex: design based on conserved motif of catalase / J. Rai, S. Raghothama, D. Sahal // J. Pept. Sci. – 2007. – V. 13. – P. 406–4128.
8. Петрова Г. П. Образование дипольных кластеров в растворах альбумина, содержащих ионы кадмия и комплексоны хелата европия / Г. П. Петрова, Ю. М. Петрусевич, Б. Д. Рыжиков и др. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 3. Физика. Астрономия. – 2003. – № 5. – С. 32–36.
9. Демченко А. П. Ультрафиолетовая спектрофотометрия и структура белков / А. П. Демченко. – К.: Наук. думка, 1981. – 208 с.
10. Prakash K. Unique oligomeric intermediates of bovine liver catalase / K. Prakash, S. Prajapati, A. Ahmad et al. // Protein Science. – 2002. – V. 11. – P. 46–57.
11. Prajapati S. Alkaline unfolding and salt-induced folding of bovine liver catalase at high pH / S. Prajapati, V. Bhakuni, K. R. Babu, S. Jain // Eur. J. Biochem. – 1998. – V. 255. – P. 178–184.

Тарадіна Г. В., Доценко О. І. Олігомерні інтермедіати каталази в розчині за дії низькочастотної вібрації. – СФ-дослідження розчинів каталази, які піддавали дії вібрації в діапазоні частот 8-32 Гц, виявило, що появу олігомерних інтермедіатів зумовлюють денатураційні зміни в області активного центру ферменту. Методом гель-електрофорезу в неденатуруючих умовах показано, що при дії вібрації в розчинах каталази можливе утворення як дисоційованих форм, так і макромолекулярних комплексів. Співвідношення між інтермедіатами, що динамічно співіснують в розчині, залежить від умов експерименту. Показана стабілізуюча дія солей, присутніх в розчині, на олігомерні інтермедіати каталази. З'ясовано, що окислення амінокислотних залишків при дії вібрації інтервалу частот 24-32 Гц може істотно впливати на процеси дисоціації каталази на субодиниці. Окислювальна модифікація каталази відбувається в напрямку: гем → ароматичні амінокислотні залишки → вторинна структура і визначається гнучкістю активного центру ферменту.

Ключові слова: каталаза печінки бика, низькочастотна вібрація, UV-спектри поглинання, нативний гель-електрофорез, асоційований стан, дисоціація.

Taradina G. V., Dotsenko O. I. Oligomeric intermediates of catalases in a solution at influence of low-frequency vibration. – UV-research of the catalase solutions treated to action of vibration in a range of frequencies of 8-32 Hz has shown that denaturation changes in the active center area of enzyme promote the appearance of oligomeric intermediates. Using a method of gel electrophoresis in non-denaturing conditions it is shown that vibration influence on catalase solutions probably cause formation both the dissociated forms, and macromolecular complexes. The ratio between intermediates dynamically coexisting in a solution, depends on experimental conditions. Stabilizing action of the salts present in the solution on oligomeric intermediates is shown. It is shown that oxidation of aminoacids residues, found under vibration in frequencies interval of 24-32 Hz, can essentially influence processes of catalases dissociation on subunits. Oxidative modification of catalase proceeds in the order: heme → aromatic amino acids → secondary structure and is defined by flexibility of the active center of enzyme.

Key words: bovine liver catalase, low-frequency vibration, UV-absorption spectra, native gel electrophoresis, associated states, dissociation.