



УДК 577.152:616.36-002

Применение хроматографических методов для очистки цитоплазматической НАД-зависимой малатдегидрогеназы из печени крыс в норме и при токсическом гепатите

Михайлова Е.В., Сафонова О.А., Попова Т.Н.

ГОУ ВПО «Воронежский государственный университет», Воронеж

Аннотация

С использованием методов дифференциального центрифугирования, гель-фильтрации через сефадекс G-25, ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе, гель-фильтрации на Тойоперл HW-65 очищена в 77,7 и 82,9 раз НАД-зависимая малатдегидрогеназа (НАД-МДГ, КФ 1.1.1.37) из гепатоцитов крыс в норме и при экспериментальном токсическом гепатите (ЭТГ) соответственно. На очищенных препаратах исследовано влияние некоторых интермедиатов цикла трикарбоновых кислот в норме и при патологии.

Ключевые слова: НАД-зависимая малатдегидрогеназа, печень крысы, токсический гепатит, очистка, хроматография, регуляция активности

Cytoplasmic NAD-depended malate dehydrogenase (NAD-MDH; EC 1.1.1.37) has been purified in 77,7 and 82,9 times from hepatocytes at norm and under toxic hepatitis (ETH) with using methods of differential centrifugation, gel-filtration on Sephadex G-25 and Toyopearl HW-65, ion-exchange chromatography on DEAE-cellulose. The research of influence of some tricarboxic cycle intermediates on enzyme activity with using of purified preparations has been carried out.

Key words: NAD-depended malate dehydrogenase, rat liver, toxic hepatitis, purification, chromatography, activity regulation

Введение

В настоящее время одной из актуальных проблем физико-химической биологии является исследование функционирования ферментов центрального метаболизма при патологиях, сопряженных с окислительным стрессом. К развитию окислительного стресса, являющегося универсальным неспецифическим звеном патогенеза ряда заболеваний, включая патологии печени, приводит интенсификация свободнорадикального окисления (СРО). [1]. В связи с этим привлекает интерес НАД-зависимая малатдегидрогеназа (КФ 1.1.1.37; НАД-МДГ), субстрат которой – малат – играет значительную роль в биохимической адаптации организма к гипоксии [2]. Имеются данные о способности малата диффундировать в митохондрии, передавая восстановительные эквиваленты в электрон-транспортную цепь (ЭТЦ), и повышать коэффициент дыхательного контроля. Известно также, что

малат участвует в транспорте низкомолекулярного антиоксиданта – цитрата, через биологические мембраны [3]. Антиоксидантную активность цитрата связывают с его хелатирующими свойствами по отношению к ионам металлов переменной валентности путем образования хелатных комплексов типа $[Me_2(\text{цитрат})_2(\text{OH})_4]^{4-}$. Поскольку для исследования свойств любого фермента необходимо получение его в высокоочищенном состоянии, то актуальным остается разработка эффективной процедуры очистки, в которой важное место отводят хроматографическим методам. В связи с вышесказанным с помощью комбинации методов хроматографии на различных носителях была проведена очистка и исследованы некоторые регуляторные свойства НАД-МДГ из цитоплазмы печени крыс в норме и при экспериментальном токсическом гепатите (ЭТГ).

Теоретическая часть

Никотинамидадениндинуклеотид-зависимая малатдегидрогеназа (НАД-МДГ; КФ 1.1.1.37) катализирует обратимую реакцию окисления L-малата в оксалоацетат (ОА). НАД-МДГ является ферментом, имеющим универсальное распространение в органическом мире: она обнаружена в клетках микроорганизмов, грибов, растений, животных. Содержание МДГ может различаться в разных тканях. В клетках животных присутствуют по крайней мере две фракции активности фермента: одна из них локализуется в митохондриях, другая – в цитоплазме. Имеются данные, что митохондриальная и цитоплазматическая формы фермента кодируются разными генами, т.е. являются изоферментами [4]. При исследовании влияния пищевой депривации на функционирование МДГ в печени крыс установлена индукция МДГ-активности и появление новой пероксисомальной изоформы, причем для пероксисомальной и цитозольной формы установлено сходство [5]. Показана достаточно низкая степень сходства для первичной структуры МДГ из различных источников. Исключение составляют некоторые участки, важные для проявления каталитической активности, связывания коферментов и формирования поверхности субъединиц. Так, существуют три остатка аргинина (Arg-102, Arg-109, Arg-171), которые высококонсервативны во всех МДГ и имеют большое значение для связывания субстрата и катализа [6]. По литературным данным, МДГ - группа мультимерных ферментов, состоящих из идентичных субъединиц (30-35 кДа), обычно организованных или как димеры или как тетрамеры [7]

Эксперимент

В качестве объекта исследования использовали самцов белых лабораторных крыс массой 180-200 г. Животных содержали на стандартном рационе вивария. ЭТГ моделировали путем однократного перорального введения CCl_4 (64 мкл на 100 г веса крысы) в вазелиновом масле в пропорции 1:3 после суточной пищевой депривации. На 4-е сутки печень после многократного перфузирования ледяным физиологическим раствором извлекали у животных и использовали для дальнейших исследований

Выделение и очистку НАД-МДГ осуществляли по схеме, включающей несколько стадий: после гомогенизации ткани печени цитоплазматическую и митохондриальную фракции гепатоцитов разделяли методом дифференциального центрифугирования в режиме 15000 g в течение 15 минут [8]. Для освобождения

ферментных препаратов НАД-МДГ от низкомолекулярных примесей использовали гель-фильтрацию на сефадексе G-25 (Fine). Суспензию геля помещали в колонку размером 1,4x20,0 см. В качестве элюирующей среды использовали 10 мМ трис-НСI-буфер (рН 8,3), содержащий 1 мМ ЭДТА и 2 мМ β-меркаптоэтанол. Собирали фракции объемом 3 мл и анализировали их на присутствие ферментативной активности. Фракции с максимальной ферментативной активностью объединяли и подвергали ионообменной хроматографии (ИОХ) на ДЭАЭ-целлюлозе. Перед использованием ионообменник подвергали специальной обработке. На каждый грамм сухого вещества добавляли 30 мл дистиллированной воды и оставляли набухать в течение 3 – 4 часов. Затем выдерживали в течение часа в 0,5 Н NaOH, потом в 0,5 Н HCl, и снова в 0,5 Н NaOH. После каждой стадии обработки ионообменник отмывали дистиллированной водой до нейтрального значения рН промывных вод [9]. Заряженный ионообменник помещали в колонку размером 1,0 x 13,0 см и уравнивали элюирующей средой вышеуказанного состава. После нанесения ферментного препарата на сорбент колонку промывали 20 мл среды элюции. Элюцию фермента проводили путем ступенчатого повышения концентрации KCl в среде элюции. Каждую фракцию объемом 2 мл анализировали на присутствие ферментативной активности НАД-МДГ. Фракции, характеризующиеся максимальной активностью, использовали для дальнейших исследований. Отделение фермента от близких по размеру и молекулярной массе белковых фракций осуществляли путем гель-фильтрационной хроматографии через Тойоперл HW-65. Суспензию геля, уравновешенную средой элюции того же состава, что и на предыдущих стадиях с добавлением 100 мМ KCl, помещали в колонку размером 1,4x64см. Калибровку колонки с Тойоперл HW-65 осуществляли с помощью набора белков-метчиков с известными молекулярными массами. Ферментный препарат наносили в объеме 2 мл. Элюцию проводили со скоростью 20 мл/час с помощью перистальтического насоса. Каждую фракцию объемом 1-2 мл анализировали на наличие ферментативной активности. Оценку чистоты полученных после заключительной стадии очистки ферментных препаратов проводили методом электрофореза в ПААГ [12], используя для проявления на белок нитрат серебра.[13]. Полученные очищенные препараты использовали для исследования свойств фермента. Все этапы выделения и очистки осуществляли при температуре 0-4⁰С.

Активность НАД-МДГ определяли спектрофотометрически при 340 нм в среде 50 мМ трис–НСI буфера, рН 8,3, содержащего 0,2 мМ оксалоацетат, 0,15 мМ НАДН. Оценку степени перекрестного загрязнения цитоплазматической и митохондриальной фракций проводили с помощью определения активности сукцинатдегидрогеназы (СДГ; маркера митохондрий) и лактатдегидрогеназы (ЛДГ; маркера цитоплазмы). Активность СДГ определяли при 600 нм [10]; активность ЛДГ - при 340 нм [9].

Общий белок определяли по методу Лоури [11].

Опыты проводили в 3-4-х кратной биологической повторности, аналитические определения для каждой пробы – в двух-трех повторностях. Для статистической обработки данных применяли стандартные статистические методы [14].

Обсуждение результатов

В соответствии с полученными нами данными, в условиях токсического гепатита, вызванного введением CCl_4 , не наблюдается достоверных изменений активности цитоплазматической НАД-МДГ по сравнению с нормой. Но, поскольку в условиях развития патологий, сопряженных с оксидативным стрессом, в связи с нарушением функционирования метаболических систем изменяется концентрация многих интермедиатов клеточного обмена, то нельзя исключить, что, несмотря на выявленную стабильность активности НАД-МДГ, изменение микроокружения может отражаться на некоторых свойствах фермента. В связи с этим нами была осуществлена очистка фермента из печени контрольных животных и крыс с ЭТГ с использованием разработанной схемы и исследован ряд регуляторных свойств НАД-МДГ в норме и при патологии.

Методом дифференциального центрифугирования была изучена субклеточная локализация НАД-МДГ в гепатоцитах в условиях нормы и ЭТГ. Результаты исследований представлены в табл.1. Показано, что активность фермента связана как с цитоплазматической, так и с митохондриальной фракциями. При этом около 90% активности НАД-МДГ клеток печени крысы локализовано в цитоплазме, и около 10% - в митохондриях. Распределение активности маркерных ферментов цитоплазмы и митохондрий (ЛДГ и СДГ соответственно) свидетельствует о том, что степень перекрестного загрязнения цитоплазматической и митохондриальной фракции клеток печени составила не более 10%.

Таблица 1. Распределение активности НАД-МДГ по субклеточным фракциям

Формы НАД-МДГ	Условия опыта	Е/г сырой массы	Удельная активность, ФЕ/мг белка	% от общей активности
Цитоплазматическая	Норма	49,08	0,968	89,69
	ЭТГ	46,99	0,916	90,72
Митохондриальная	Норма	5,64	0,705	10,31
	ЭТГ	4,79	0,614	9,25

Результаты очистки НАД-МДГ из цитоплазмы клеток печени контрольных и подвергнутых ЭТГ крыс представлены в таблице 2. На начальных стадиях очистки с целью отделения низкомолекулярных примесей от белкового препарата была использована гель-хроматография на сефадексе G-25. Хотя хроматография на данном носителе не позволяет отделить одни высокомолекулярные вещества от других, на этой стадии очистки нам удалось освободиться от $\approx 30\%$ белков. Это может быть объяснено тем, что для дальнейшей очистки нами использовались только фракции, обладающие наибольшей активностью фермента. Основное значение для отделения посторонних белков имели стадии ИОХ на ДЭАЭ-целлюлозе и гель фильтрации на Тойоперл НВ-65. Так, после ИОХ содержание белка по сравнению с цитоплазмой снизилось в 21 раз в норме и 24 раза при патологии. Десорбция НАД-МДГ с колонки ДЭАЭ-целлюлозы происходила при увеличении концентрации KCl в среде элюции с 35 до 80 мМ. После заключительного этапа выделения фермента с использованием Тойоперл НВ-65 степень очистки по белку составила 298 и 302 раза в норме и при ЭТГ соответственно.

Таблица 2. Очистка цитоплазматической НАД-зависимой малатдегидрогеназы из печени контрольных животных и крыс с токсическим гепатитом

Стадия очистки	Условия опыта	Активность, Е	Количество белка, мг	Удельная активность, Е/мг белка	Выход, %	Степень очистки
Цитоплазматическая фракция	Норма	49,079±2,250	50,69±2,480	0,968±0,047	100	1
	ЭТГ	46,990±2,246	51,29±2,470	0,916±0,046	100	1
Гель-фильтрация на сефадексе G-25	Норма	48,005±2,200	36,88±1,630	1,302±0,065	97,81	1,35
	ЭТГ	45,734±2,170	36,78±1,645	1,243±0,060	97,33	1,36
Ионообменная хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе	Норма	32,196±1,450	2,34±0,110	13,759 ±0,070	65,60	14,21
	ЭТГ	29,398±1,440	2,13±0,105	13,802 ±0,070	62,56	15,06
Гель-хроматография на Тойоперл HW-65	Норма	12,782±0,565	0,17±0,075	75,188 ±3,655	26,04	77,67
	ЭТГ	12,902±0,555	0,17±0,080	75,89 ±3,670	27,46	82,85

Таким образом, с помощью разработанной схемы очистки были получены очищенные в 77,7 и 82,9 раз ферментные препараты НАД-МДГ с удельной активностью 75,19±3,66 и 75,89±3,67 Е/мг белка из гепатоцитов крыс в норме и при ЭТГ соответственно. Выход составил 26,0% и 27,5% для фермента из нормальной и пораженной CCl_4 печени. Высокий выход фермента свидетельствует о том, что используемая комбинация хроматографических методов позволяет выделить чистый ферментный препарат с относительно небольшими потерями.

Исследование чистоты полученного после гель-хроматографии на Тойоперл HW-65 ферментного препарата с помощью метода гель-электрофореза в ПААГ показало, что фермент как в норме, так и при патологии был получен в гомогенном состоянии (рис.1.).

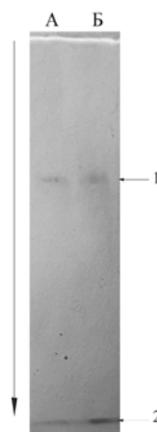


Рис.1. Электрофореграмма НАД-зависимой малатдегидрогеназы из печени крыс в норме (А) и при экспериментальном гепатите (Б) после проявления на белок: 1 – зона локализации фермента, 2 – фронт маркера (бромфеноловый синий); стрелкой показано направление движения белка при электрофорезе.

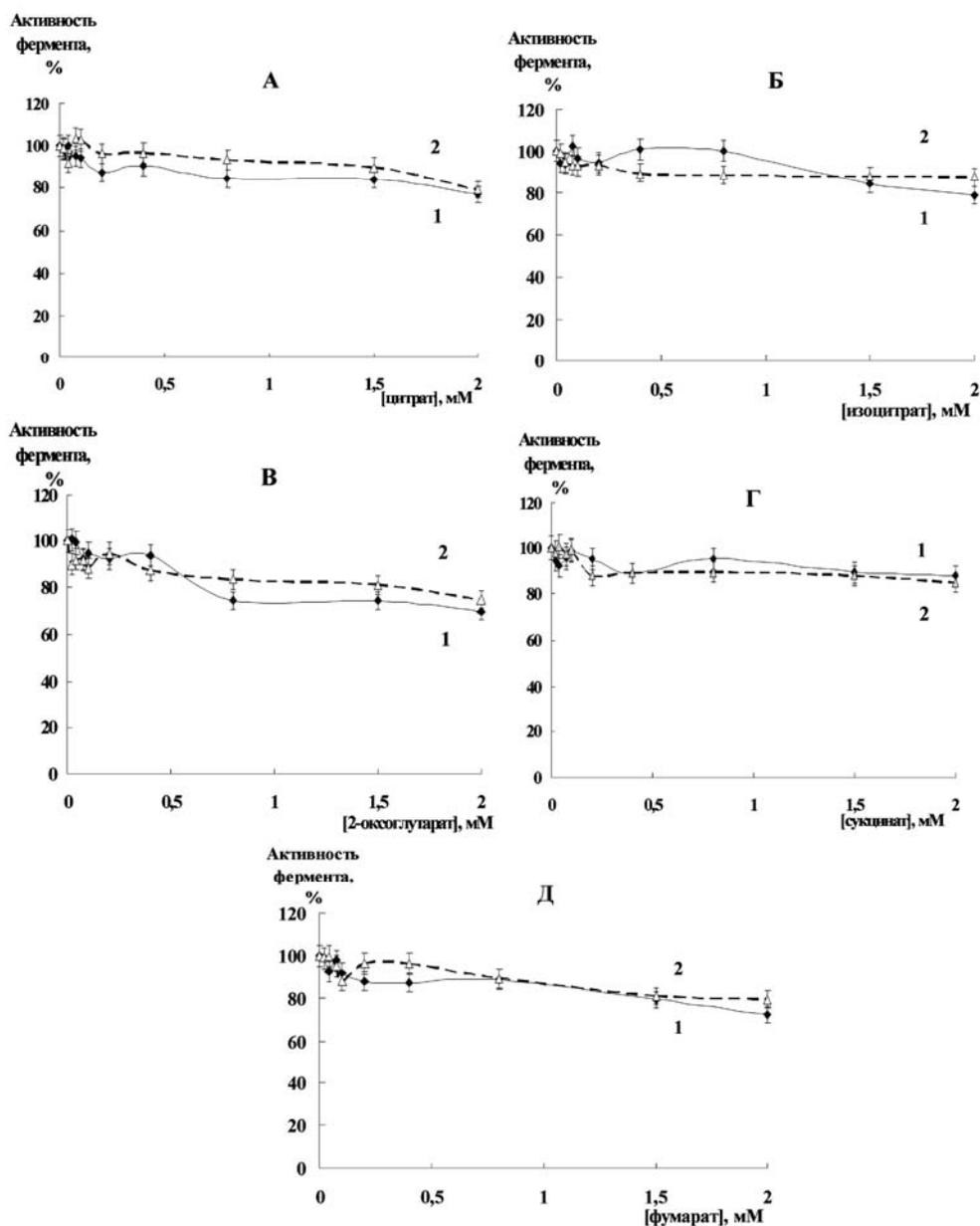


Рис. 2. Влияние цитрата (А), изоцитрата (Б), 2-оксоглутарата (В), сукцината (Г) и фумарата (Д) на активность НАД-малатдегидрогеназы из цитоплазмы печени контрольных животных (1) и крыс с токсическим гепатитом (2).

С использованием полученных гомогенных препаратов было проведено исследование влияния на активность НАД-МДГ таких клеточных метаболитов, как цитрат, изоцитрат, 2-оксоглутарат, сукцинат и фумарат. Согласно полученным результатам, данные соединения оказывают ингибирующее влияние на фермент как в норме, так и при ЭТГ. Так, цитрат в концентрации 2 мМ тормозит активность НАД-МДГ из печени контрольных животных и крыс опытной группы примерно на 20% (рис.2А). Изоцитрат также снижает активность НАД-МДГ, причем степень ингибирования для фермента в норме и при патологии различна. Так, при концентрациях 0,4-0,8 мМ для НАД-МДГ из гепатоцитов крыс с ЭТГ отмечено незначительное торможение активности; в норме же данный эффект не был выявлен. В то же время изоцитрат в концентрации 2 мМ снижает активность фермента в норме в большей степени, чем при патологии (рис.2Б). Показано, что 2-оксоглутарат

и фумарат в концентрациях выше 0,5 мМ и сукцинат в концентрациях выше 0,2 мМ также ингибируют исследуемый фермент как в норме, так и при ЭТГ (рис.2В, 2Г, 2Д).

Таким образом, при исследовании действия указанных интермедиатов на активность НАД-МДГ в большинстве случаев был выявлен незначительный ингибирующий эффект, причем достоверных различий между значениями в норме и при патологии печени отмечено не было. Согласно литературным данным, в регуляции активности МДГ в клетке могут участвовать многие низкомолекулярные соединения. Так, некоторые органические кислоты, представляющие собой субстраты-аналоги МДГ (малонат, фумарат, цитрат, цис-аконитат) могут являться конкурентными ингибиторами этого фермента [6]. Имеются сведения, что активность МДГ снижают сукцинат [5] и α -кетоглутарат [15] и некоторые другие соединения.

Заключение

Таким образом, с использованием разработанной схемы очистки фермента, включающей различные виды хроматографии, был получен высокоочищенный препарат цитоплазматической НАД-МДГ. Было выявлено сходство в регуляции активности фермента рядом внутриклеточных метаболитов в норме и при патологии. В то же время отмечены незначительные различия во влиянии изоцитрата на НАД-МДГ из контрольной и пораженной CCl_4 печени.

Список литературы

1. Андреешева Е.М., Попова Т.Н., Артюхов В.Г. Интенсивность свободнорадикального окисления и каталитические свойства NADP-изоцитратдегидрогеназы в печени крысы в норме и при токсическом гепатите // Биомедицинская химия. 2006. Т. 52, № 2. С. 153-160
2. Глотов Н.А., Шмелева Л.Т. Влияние гипоксии и глютаминовой кислоты на содержание кетокислот в миокарде и почках крыс // Укр. биохим. журн. 1973. № 5. С. 605-608.
3. Robinson V.H., Olei J. Citrate transport in guinea pig heart mitochondria // Biochem. 1975. V. 53, № 5. P. 643-64.
4. Ленинджер А. Основы биохимии: в 3-х томах. М. Мир. 1985. 1056 с.
5. Косматых Т. А. Физикохимические и кинетические свойства изоформ малатдегидрогеназы из гепатоцитов голодающих крыс : дис. канд-та биол. наук : 030004 : защищена 29.11.02. Воронеж. 2002. 148 с.
6. Епринцев А.Т., Попов В.Н., Шевченко М.Ю. Экспрессия и регуляция ферментов глиоксилатного цикла. Воронеж. Центрально-черноземное книжное издательство. 2005. 224 с.
7. Иванищев В.В., Курганов Б.И. Ферменты метаболизма малата: характеристика, регуляция активности и биологическая роль // Биохимия. 1992 . Т. 57, № 5. С. 653-662.
8. Прохорова М.И. Методы биохимических исследований. Л. Изд-во ЛГУ. 1982. 272 с.
9. Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии. М. Высшая школа. 1980. 272с.

10. Cooper T.G., Beevers H. Mitochondria and glyoxisomes from castor been endosperm // J. Biol. Chem. 1969. V. 244, № 13. P. 3507-3513.
 11. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. Protein measurement with the Folin-Phenol reagent // J. Biol. Chem. 1951. V.194, № 1. P.265-271.
 12. Davis B.J., Jones R.G., Farmer G.R. Disk-electrophoresis. Method and application to human surum proteins // Ann. N. Y. Acad. Sci. 1964. V. 121. P. 404-427.
 13. Shevchenko A., Wilm H., Vorm O. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide // Anal. Chem. 1996. V.68. P.850-858.
 14. Ллойд Э., Ледерман У. Справочник по прикладной статистике. М. Финансы и статистика. 1990. С. 493 – 513..
 15. Hartl T. Die Malat-Dehydrogenase des Archebacteriums Sulfolobus acidocaldarius. Reinigung, kristallisation und Charakterisierung: diss. dokt. naturwis fak. chem. univ. Stuttgart, 1987. 169 p.
-

Михайлова Елена Владимировна - аспирант кафедры аналитической и медицинской биохимии и микробиологии, Воронежский госуниверситет, биолого-почвенный факультет, Воронеж, тел. (4732)20-82-78 (р.);

Сафонова Ольга Анатольевна - к.б.н., ассистент, кафедра аналитической и медицинской биохимии и микробиологии, биолого-почвенный факультет, Воронежский госуниверситет г.Воронеж, тел. (4732) 20-82-78

Попова Татьяна Николаевна - д.б.н., проф., кафедра аналитической и медицинской биохимии и микробиологии, биолого-почвенный факультет, Воронежский госуниверситет, тел.: (4732) 20-82-78

Mikhailova Elena V. - post-graduate student, Department of Medical Biochemistry and Microbiology, Biology and Soil Science Faculty, Voronezh State University, Voronezh, E-mail: mikhailova@bio.vsu.ru

Safonova Olga A. - Cand.Biol.Sci., assistant Department of Medical Biochemistry and Microbiology, Biology and Soil Science Faculty, Voronezh State University, Voronezh,

Popova Tatyana N. - Dr.Sci.Biol., professor, Department of Medical Biochemistry and Microbiology, Biology and Soil Science Faculty, Voronezh State University