



Исследование четвертичной структуры липазы из *rhizopus niveus*

Беленова А.С., Ковалева Т.А., Артюхов В.Г.,
Трофимова О.Д., Багно О.П.

Воронежский государственный университет, Воронеж

Аннотация

При помощи методов гель-хроматографии, электрофореза и ИК-спектрофотометрии исследована четвертичная структура липазы из *Rhizopus niveus*. Показано, что фермент состоит из двух субъединиц с молекулярной массой 48 кДа, обладающих каталитической активностью. Установлено, что ионы кальция являются необходимыми в гидролизе и предположительно входят в состав Са-связывающего домена, поддерживая каталитически активную конформацию фермента

Введение

В последние годы при усовершенствовании многих технологических процессов широко используются гидролитические ферменты микроорганизмов.

Исследование физико-химических свойств, кинетико-термодинамических параметров, особенностей фермент-субстратных взаимодействий при осуществлении акта катализа гидролитическими ферментами способствуют существенному изменению и усовершенствованию многих известных технологий и созданию новых.[1,2,3].

Возрастающие масштабы использования липаз в биотехнологии вызывают необходимость получения знаний о регуляции биологических свойств данного фермента. Для этого требуется детальное исследование не только физико-химических и термодинамических свойств липазы, но и особенностей ее структуры.

Объекты и методы исследования

В качестве объекта исследования служил коммерческий препарат липазы. Определение каталитической активности липазы проводили спектрофотометрическим методом Андерсона – Маккарти. За единицу активности принимали количество жирных кислот, выделенных в единице объема за единицу времени.

Определение количества белка в препарате липазы осуществляли методом Лоури [4], гомогенность ферментных препаратов контролировали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле по Дэвису [5].

Регистрацию инфракрасных спектров поглощения липазы проводили на ИК-спектрофотометре Specord M-80 в диапазоне 4000-400 см⁻¹.

Эксперимент

При исследовании олигомерных ферментов достоверную информацию дает метод гель-хроматографии. Сочетание этого метода и подбора определенных условий позволяет достичь разделения белковых субъединиц. В связи с этим была проведена гель-хроматография образца липазы после инкубации с $2,7 \cdot 10^{-4}$ моль/л раствором додецилсульфата натрия, разрушающего четвертичную структуру. На колонку наносили 1 мл раствора липазы, прошедшего обработку детергентом в течение 30 мин. при 37°C . Элюцию осуществляли фосфатно-цитратным буфером (рН 7,0). Результаты хроматографии представлены на рис. 1.

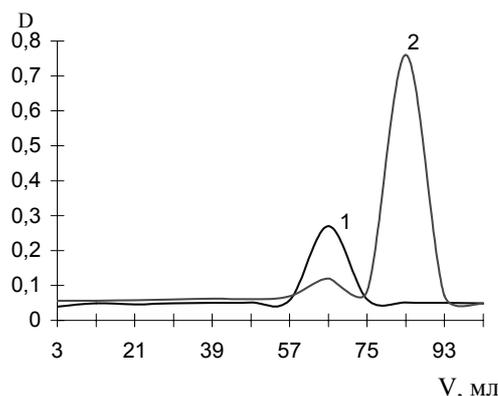


Рис. 1. Профиль элюции липазы до и после инкубации с ДСН
Обозначения: 1 – нативная липаза; 2 – липаза после инкубации с ДСН

При гель-хроматографии на колонке с Toyopearl HW 55 субъединицы выходили в одном объёме, что позволяет сделать предположение о симметричности их строения.

Для подтверждения и дополнения данных хроматографического анализа был использован метод электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии ДСН (рис. 2).

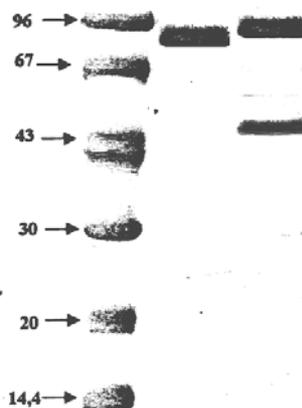


Рис. 2. Электрофореграмма липазы и ее субъединиц

Согласно полученным результатам молекула липазы состоит двух субъединиц с молекулярной массой 48 ± 2 кДа, каталитическая активность которых составляет $8,0 \pm 0,2$ ед/мг.

Для более детального исследования особенностей вторичной структуры субъединиц липазы были зарегистрированы ИК-спектры нативной липазы и её протомеров (рис. 3, 4).

Для нативной формы липазы характерны полосы поглощения: амид I ($1630 - 1690 \text{ см}^{-1}$), амид II ($1520 - 1560 \text{ см}^{-1}$), полоса валентных колебаний NH_2 – группы ($3200 - 3400 \text{ см}^{-1}$).

Имеющаяся полоса поглощения $3200-3450 \text{ см}^{-1}$ отвечает колебательным переходам в результате растяжения NH -связи; Поглощение при 2920 см^{-1} соответствует симметричным

колебаниям метильных групп. Ряд пиков в области $1739 - 1970 \text{ см}^{-1}$ обусловлен колебаниями карбонильных групп в концевых ассоциированных COOH -группах.

Для ИК-спектра субъединиц липазы с молекулярной массой 48 кДа наблюдается незначительное смещение полос амид I и амид II в области с более низкой энергией и уменьшение интенсивности их колебаний, что может указывать на уменьшение числа водородных связей, участвующих в стабилизации вторичной структуры липазы. Наблюдаемое уменьшение уровня колебаний в области $3320-3493 \text{ см}^{-1}$, очевидно, свидетельствует об увеличении количества нерегулярных участков, появляющихся при разрушении четвертичной структуры. Кроме того в данной области наблюдается более четкое разделение пиков поглощения, обусловленных наличием в молекуле α -спиралей, β -структур и нерегулярных участков. В области 2860 см^{-1} имеет место изменение интенсивности полос, что может быть обусловлено изменением конформации по сравнению с нативной молекулой и появлением гидрофобных аминокислот на поверхности субъединиц.

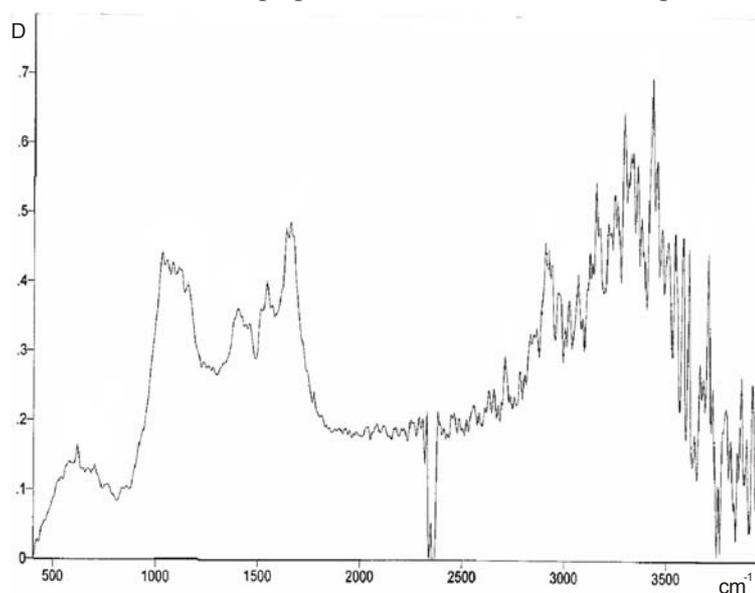


Рис. 3. ИК-спектр нативной липазы

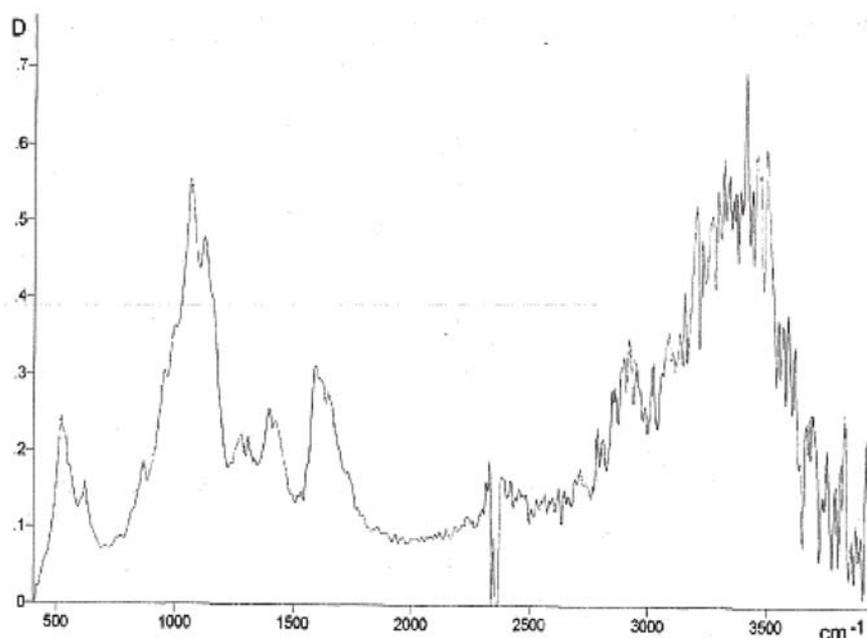


Рис. 4. ИК-спектр субъединиц липазы

Были рассчитаны параметры нормальных колебаний для α -спиралей и β - структур и соответствующие экспериментальным данным (табл. 1).

Таблица 1. Содержание типов вторичной структуры в липазе и её протомерах

конформация	Липаза			субъединицы		
	ν , см^{-1}	D	%	ν , см^{-1}	D	%
α -спирали	1656	0,47	22	1654	0,25	19
β -структуры	1691	0,45	45	1623	0,28	37
неупорядоченные формы	1627	0,46	33	1648	0,27	44

Выявлено, что во вторичной структуре субъединиц липазы наблюдается уменьшение количества α -спиралей на 15 %, уменьшение количества β - структур на 18 % и увеличение количества неупорядоченных участков на 25 % по сравнению с нативной формой липазы.

Результаты экспериментов по ИК – спектроскопии отдельных субъединиц липазы позволяют сделать заключение о том, что четвертичная структура липазы поддерживается гидрофобными «силами сцепления», что способствует увеличению мобильности фермента в процессе образования фермент – субстратного комплекса. Четвертичная структура фермента принимает участие в регуляции каталитической активности за счет взаимодействия субъединиц [7].

Для проведения наиболее полного анализа четвертичной структуры было изучено влияние ионов кальция на каталитическую активность липазы. В этом отношении особый интерес представляет отделение металла от апофермента, сопровождающееся исчезновением или снижением ферментативной активности, а также последующая реактивация фермента путем добавления металла.

В связи с этим было изучено влияние этилендиамидтетраацетата [ЭДТА], связывающего ионы двухвалентных металлов, на каталитическую активность липазы и ее субъединиц.

Инкубацию фермента модификатором осуществляли в течение 20 мин. при температуре 37°C , затем вносили субстрат и осуществляли реакцию гидролиза с последующим определением каталитической активности. Результаты эксперимента представлены на рис.6.

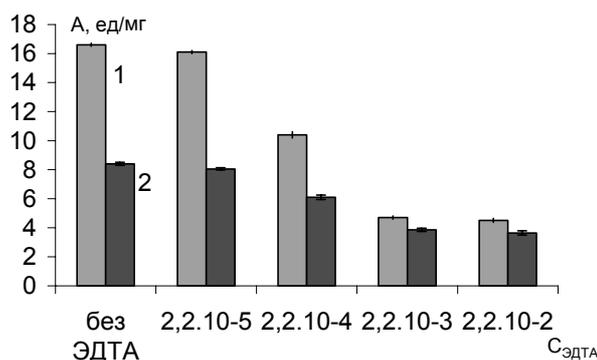


Рис. 6. Влияние ЭДТА на каталитическую активность липазы и её субъединиц: 1 – нативная липаза; 2 – протомеры липазы

Снижение каталитической активности липазы и ее субъединиц наблюдается при воздействии ЭДТА в концентрации $2,2 \cdot 10^{-5}$ моль/л. Показано, что максимальный ингибирующий эффект ЭДТА имеет место при концентрации $2,2 \cdot 10^{-2}$ моль/л.

Далее нами было исследовано влияние ионов Ca^{2+} (раствор CaCl_2 в концентрации 10^{-3} моль/л) на процесс реактивации активности липазы после угнетения ЭДТА (10^{-3} моль/л). Для этой цели фермент после инкубации с реагентом пропускали через хроматографическую колонку, упакованную сефадексом G-25, для удаления ЭДТА из

реакционной смеси. Затем ферментный раствор инкубировали в течение 60 минут при температуре 37°C с раствором CaCl₂ и определяли каталитическую активность в стандартных условиях. Результаты экспериментов показаны на рис. 7.

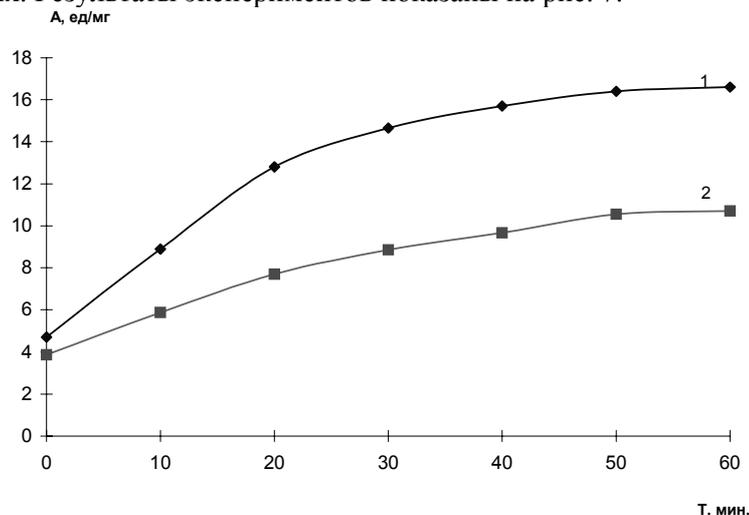


Рис. 7. Влияние ионов Ca²⁺ на каталитическую активность липазы и её субъединиц: 1 – нативная липаза; 2 – протомеры липазы

Показано, что гидролитическая активность, как нативного фермента, так и его протомеров полностью восстанавливалась, чему способствовало, по-видимому, возвращение ионов металла в состав Ca-связывающего домена молекулы фермента [9, 10, 11].

Для подтверждения полученных данных нами была проведена ИК-спектроскопия субъединиц липазы после их инкубации с ионами Ca²⁺ (рис. 8).

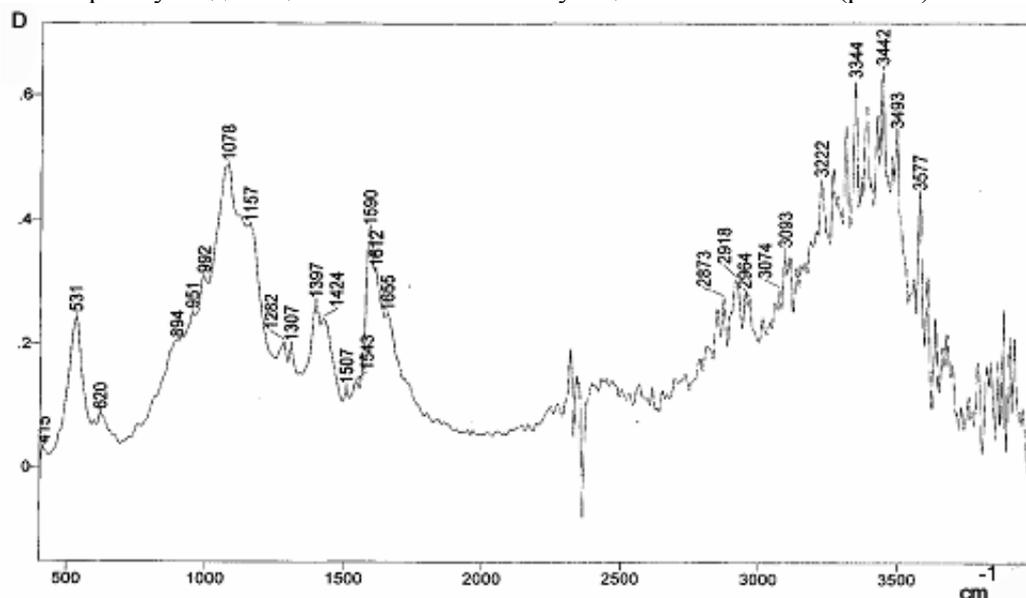


Рис. 8. ИК-спектр субъединиц липазы после инкубации с ионами Ca²⁺

Для субъединиц, после взаимодействия с ионами Ca²⁺ (по сравнению с ИК-спектром субъединиц) ИК-спектр не претерпевал значительных изменений. Незначительное увеличение интенсивности колебаний полос амид I и амид II, по-видимому, свидетельствует об увеличении числа водородных связей, участвующих в стабилизации вторичной структуры липазы.

Анализ экспериментальных данных по изучению четвертичной структуры липазы методами гель-хроматографии, электрофореза, а так же ИК-спектроскопии нативного

фермента и его протомеров позволяет сделать заключение о том, что молекула липазы представляет собой сложный олигомерный белок, состоящий из двух идентичных субъединиц, обладающих каталитической активностью. Данный фермент *in vivo* может функционировать как в состоянии димера, так и в виде отдельных протомеров. Ионы кальция являются необходимыми в гидролизе триглицеридов и предположительно входят в состав Са-связывающего домена липазы, поддерживая каталитически активную конформацию фермента.

Список литературы

1. Полторак О.М. Физико-химические основы ферментативного катализа / О.М. Полторак, Е.С. Чухрай. – М.: Высшая школа, 1971. – 311 с.
2. Можаяев В.В. Иммобилизация ферментов как новый подход к решению фундаментальных проблем энзимологии / В.В. Можаяев // Успехи биологической химии. – 1983. – Т.24. – С.99-134.
3. Варфоломеев С.Д. Кинетические методы в биохимических исследованиях / С.Д. Варфоломеев, С.В. Зайцев. – М.: Изд-во Моск. Ун-та, 1982. – 343 с.
4. Клинов Д.В., Мартынкина Л.П., Юрченко В.Ю., Демин В.В., Стрельцов С.А., Герасимов Ю.А., Венгеров Ю.Ю. // Биоорганическая химия, 2003. Т. 29. № 4. С. 397-402.
5. Любарев А.Е., Курганов Б.И. // Биохимия, 1998. Т. 63. № 4. С. 516-523.
6. Суханов Т.Е., Вылегжанина М.Э., Копейкин В.В., Баклагина Ю.Г., Хрипунов А.К., Нилова В.К., Ткаченко А.А. // Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования, 2006. № 6. С. 132-138.
7. Noble M. E. M. Analysis of the structure of *Pseudomonas glumae* lipase/ M. E. M. Noble, A. Cleasby, L. N. Johnson, M. R. Egmond, L. G. J. Frenken// Protein Engineering. – 1994. - Vol.7, №4. – P.559-562.
8. Ковалева Т.А. Физико-химические и кинетико-термодинамические аспекты катализа свободной и иммобилизованной амилаз / Т.А. Ковалева - Воронеж: ВГУ, 1998. – 421с.
9. Amada K. Ca⁽²⁺⁾-induced folding of a family 1.3 lipase with repetitive Ca⁽²⁺⁾-binding motifs at the C-terminus / K. Amada // FEBS Lett. – 2001. – V.509, №1. – P. 17-21.
10. Tanaka A. Differential scanning calorimetry of the effects of Ca⁽²⁺⁾ on the thermal unfolding of *Ps. cepacia* lipase / A. Tanaka // Biosci Biotechnol Biochem. – 2003. – V.67, №1. – P. 207-210.
11. Suzuki M. Purification and General Properties of a Metal-Insensitive Lipase from *Rhizopus japonicus* NR 400 / M. Suzuki, H. Yamamoto, M. Mizugaki // J. Biochem. – 1986. – V.100, №5. – P. 1207-1213.