

УДК 577.158

ТЕРМОІНАКТИВАЦІЯ 5-ЛІПОКСИГЕНАЗИ КАРТОПЛІ ТА ВПЛИВ ФОСФАТИДНОЇ КИСЛОТИ НА ЕНЕРГІЮ АКТИВАЦІЇ ПРОЦЕСУ ДЕНАТУРАЦІЇ

Т. Д. СКАТЕРНА, Г. І. ХАРИТОНЕНКО, О. В. ХАРЧЕНКО

Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України, Київ;
e-mail: skaternaya@bpci.kiev.ua

Досліджено вплив фосфатидної кислоти (ФК) – алостеричного активатора 5-ліпоксигенази (5-ЛО) з бульб картоплі на термодинамічні параметри термоінактивації ензиму з метою встановлення структурно-функціональних зв'язків окремих компонентів апарату ліпідного обміну: ліпоксигеназ та фосфоліпідів мембран.

Встановлено, що ФК суттєво змінює термостабільність 5-ЛО, зокрема у його присутності відбувається зростання енергії активації (E_a) денатурації ензиму в декілька разів. Подібні зміни можуть свідчити, що взаємодія фосфоліпиду ФК із 5-ЛО призводить до певних конформаційних змін ензиму, можливо обумовлених гідрофобними взаємодіями. Одержані результати дають можливість спробувати пояснити механізм дії ФК як алостеричного активатора 5-ЛО, який здатний заміщати молекули субстрату у місцях їхнього зв'язування та підвищувати рівень утворення специфічних продуктів 5-ліпоксигеназного окислення лінолевої кислоти.

Ключові слова: 5-ліпоксигеназа, ліолева кислота, алостеричний ефектор, фосфатидна кислота, термоінактивація.

Пероксидне окислення ліпідів клітинної мембрани характерно для всіх біологічних систем. Продуктами є гідропероксиди поліненасичених жирних кислот (ПНЖК) та їхні похідні, які називають оксиліпінами. Гідропероксиди ПНЖК утворюються завдяки хімічному окисленню або дії ензимів клітини, таких як ліпоксигенази (ЛО) [1]. Метаболізм ПНЖК (опосередкований дією ЛО) та наступні реакції каскаду перетворення метаболітів загалом складають ліпоксигеназний шлях. Ліпоксигенази (КФ 1.13.11.12) широко розповсюджені в аеробних організмах, у т.ч. рослинах. Продукти окислення 5-ліпоксигенази демонструють біологічну активність: антимікробну, фунгіцидну, беруть участь у відповіді рослини на поранення [2]. За функціональними особливостями ЛО картоплі подібна до ЛО ссавців. Для каталізу 5-ЛО необхідна сорбція ензиму на поверхні мембрани. Фосфоліпіди біологічної мембрани через фосфоліпідзв'язувальний сайт здатні впливати на активність 5-ЛО з бульб картоплі [3]. У попередніх роботах показано, що фосфатидна кислота, фосфатидилінозит, фосфатидилсерин здатні активувати, а фосфатидилхолін інгібувати перебіг ліпоксигеназного каталізу [4,5]. Також було показано, що 5-ЛО у присутності 50 мкМ фосфатидної кислоти (ФК) має два

оптимиуми рН (pH_{opt}): 5,0 та 6,9. У концентрації 50 мкМ ФК здатна активувати 5-ЛО у 15 разів при рН 5,0. Крім того, 5-ЛО виявляє позитивну кооперативність щодо субстрату. Присутність ФК змінює значення коефіцієнта Хілла (h) щодо субстрату лінолевої кислоти. У випадку недостатності субстрату ензим виявляє позитивну кооперативність щодо ФК, приєднуючи від 3-х до 4-х молекул ефектора при рН 5,0, тобто фосфоліпід виступає як алостеричний регулятор 5-ЛО [6].

З метою перевірити чи впливає ФК на термодинамічні параметри термоінактивації ензиму досліджено термоінактивацію 5-ЛО з бульб картоплі за відсутності та у присутності фосфоліпиду при рН 5,0 та 6,9.

Матеріали і методи

У роботі використовували ліолеву кислоту (ЛК), луброл РХ, фосфатидну кислоту (Sigma, США), ДЕАЕ-Тоуорепарл (Toyo Soda, Японія), бутил-сефарозу (Pharmacia, Швеція), бромтимоловий синій (Serva, Німеччина), кислоти, солі, луги кваліфікації хч і осч.

5-ЛО з бульб картоплі виділяли за методом, описаним у роботі [5]. Питома активність препарату ензиму складала $2,6 \cdot 10^{-4}$ М/хв на 1 мг протеїну.

Термоінкубацію 5-ЛО проводили при температурі: 30, 40, 50, 60 та 70 °С. Попередньо 5–7,6 мкг ензиму за допомогою діалізу переводили в 0,1 М натрій-фосфатний (рН 6,9) або 0,1 М натрій-ацетатний (рН 5,0) буферні розчини, які потім інкубували при відповідній температурі. При дослідженні впливу ФК на термоінактивацію 5-ЛО, ензим інкубували у присутності цього фосфоліпиду при відповідній температурі. Дію температурного чинника припиняли, занурюючи проби у воду з льодом. Після термоінкубації, розчин ензиму з ФК (15 або 50 мкМ) переносили до реакційної суміші (загальним об'ємом 2,5 мл), яка містила 0,1 М натрій-фосфатний (рН 6,9) або 0,1 М натрій-ацетатний (рН 5,0) буферні розчини; 0,02% лубролу РХ; 100 мкМ ЛК. За перебігом реакції спостерігали при λ 235 нм, що відповідає максимуму поглинання сполученого дієнового хромофору в молекулі гідропероксиду ЛК. Реакцію проводили при постійній температурі $25 \pm 0,1$ °С. Молярний коефіцієнт поглинання продукту реакції вважали рівним $23\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [5]. Кінетичні вимірювання проводили на спектрофотометрі Specord M-40 (Carl Zeiss, Німеччина).

Константу іонізації бромтимолового синього визначали спектрофотометрично за поглинанням при 620 нм в інтервалі рН від 4,5 до 9,2. Концентрація індикатора становила 0,00045%. Вимірювання проводили при температурі 23 ± 1 °С.

Результати та обговорення

Відомо, що 5-ЛО ссавців демонструє високу спорідненість до фосфоліпідів мембранного матриксу завдяки наявності в його будові N-кінцевого β -складчастого домену [7], побудованого гідрофобними амінокислотами. З робіт [5,6] видно, що фосфоліпиди мембран здатні впливати на активність 5-ЛО та можуть бути алостеричними регуляторами ензиму за рахунок заміщення молекул субстрату ЛК у регуляторному центрі. У разі ФК спостерігається різний вплив на ензим. У присутності 50 мкМ ФК спостерігається два рН_{опт.} дії 5-ЛО – 5,0 та 6,9. Так, при рН 5,0 ФК активує 5-ЛО у 15 разів. За таких умов значення максимальної швидкості реакції (V_{\max}) збігається зі значенням V_{\max} ліпоксигеназної реакції без ефектора при рН 6,9 [6].

Термоінактивацію досліджували при двох значеннях рН – 6,9 та 5,0 – без та у присутності 15 і 50 мкМ ФК відповідно (рис. 1). Залежність інактивації 5-ЛО від часу описується кінетикою першого порядку, тому константу

швидкості (k) інактивації визначали відповідно до рівняння:

$$\log(A_t/A_0) = -(k/2,303)t,$$

де A_0 – початкова ензиматична активність, A_t – активність після нагріву для часу t . Нахил кривої визначали методом лінійної регресії, константи швидкості графічно представляли в координатах Арреніуса. Енергію активації (E_a) розраховували з нахилу залежності $\ln(k)$ від $1/T$ відповідно до рівняння:

$$\ln(k) = -E_a/RT + c,$$

де R – газова постійна ($8,314\text{ Дж} \cdot \text{моль}^{-1}\text{K}^{-1}$) та T – температура в K (рис. 2) [8].

Згідно з даними літератури значення E_a для ліпоксигеназ залежно від джерела та температурного інтервалу (від 40 до 100 °С) знаходиться в діапазоні 65–655 кДж/моль [9]. У роботі [10] значення E_a для 5-ЛО при термоінкубації ензиму у буферному розчині (рН 6,3) дорівнює 27,7 кДж/моль і нижче порівняно з результатами, одержаними раніше – 40,8–46,5 кДж/моль [11] та в цій роботі при рН 6,9 – 175,6 кДж/моль (таблиця). Можливо це пояснюється різними умовами проведення експерименту та ступенем очистки препарату ензиму. Хоча для ліпоксигеназ томату значення E_a термоінактивації дорівнює 191 кДж/моль [9]. Також на термодинамічний показник ензиму впливає середовище інкубації. Інкубація 5-ЛО в міцелярній системі [10], яка моделює мембранну поверхню, призводить до збільшення енергії активації ензиму в 1,6 раза, що свідчить про певні конформаційні перебудови молекули при взаємодії з поверхнею міцел. Це підтверджується дослідженнями сорбції рекомбінантної 5-ЛО людини на поверхню фосфатидилхолінових везикул методом флуоресцентної спектроскопії [7].

Як видно з таблиці, швидкість інактивації 5-ЛО залежить від рН реакційного середовища. Значення констант швидкості k термоінактивації при рН 6,9 (рис. 1) значно менші, ніж при рН 5,0. У той самий час, значення E_a при рН 6,9 в 3,6 раза вище порівняно зі значенням E_a при рН 5,0 (рис. 2). У літературі описано випадки коли швидкість інактивації залежить від рН [8] та складу розчину, в якому знаходиться ензим. Аналогічні результати було отримано для ЛО гороху коли зміна рН істотно впливала на швидкість інактивації, але при цьому мало змінювала значення енергії активації [8]. Окремо треба зазначити, що рН середовища також впливало на температурний діапазон досліджень. При нейтральному

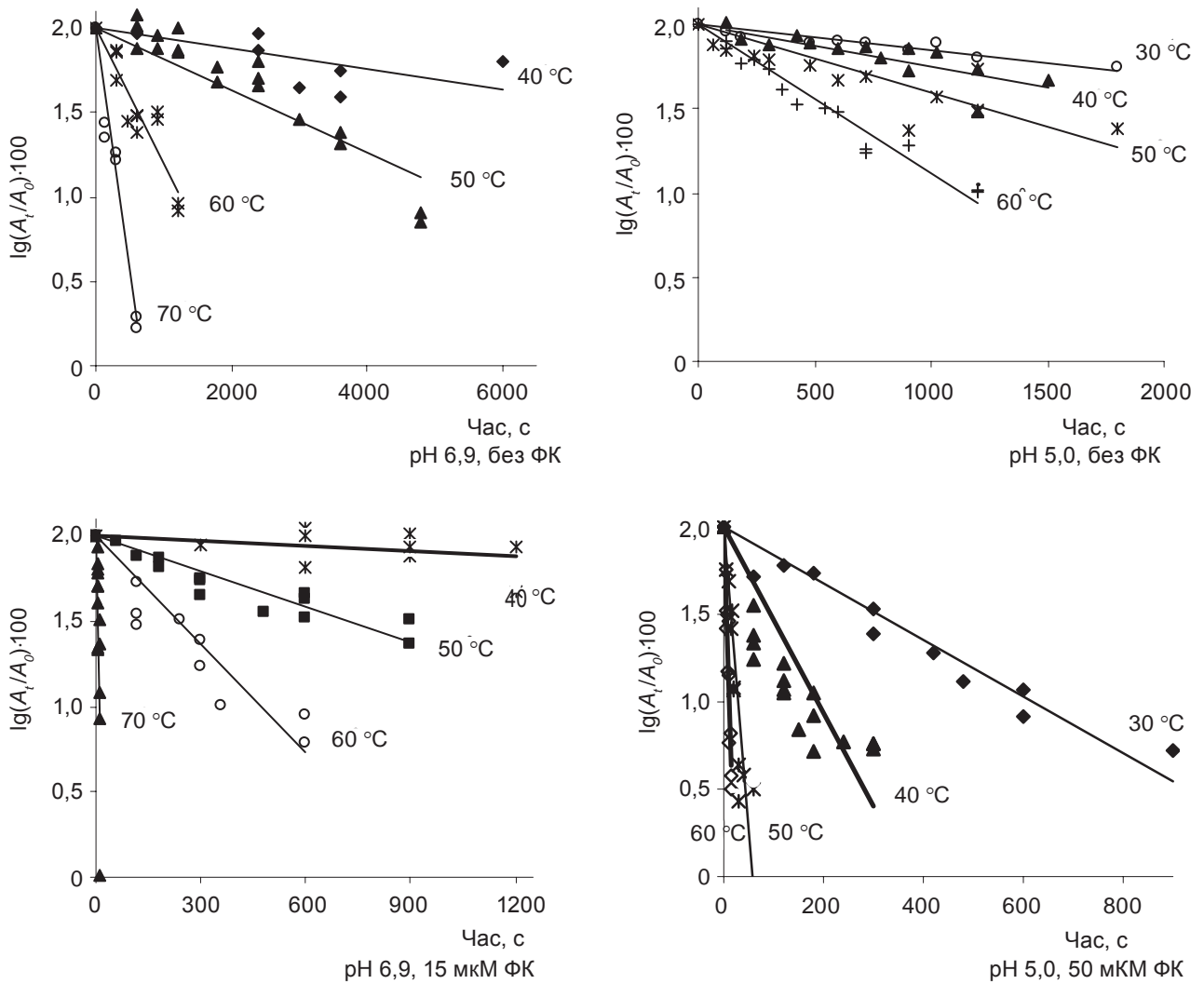


Рис. 1. Залежність логарифма $(A_t/A_0) \cdot 100$ від часу інкубації 5-ліпоксигенази при pH 6,9 та 5,0 без/з фосфатидною кислотою при концентрації 15 та 50 мкМ відповідно

pH ензим стабільніший, протягом 120 хв при 30 °C інактивація 5-ЛО не спостерігається. Це можна пояснити тим, що джерело ензиму – картопля – рослина теплолюбива і потребує для вегетації достатньо високої температури. Оптимальний температурний діапазон ензиму при pH 5,0 знаходиться в інтервалі від 30 до 60 °C, тоді як за звичайних умов при pH 5,0 активність 5-ЛО невисока [6].

У свою чергу, присутність фосфоліпиду ФК також суттєво змінює значення k та E_a . При pH 6,9 значення E_a збільшується у 1,16 раза, а при pH 5,0 енергія активації денатурації зростає у 2,6 раза. Аналогічна закономірність простежується в разі впливу ФК на активність 5-ЛО (pH 6,9) у присутності 15 мкМ ФК (концентрація, при якій спостерігається максимум активації 5-ЛО) активність ензиму зростає у

1,5 раза, тоді як при концентрації 50 мкМ ФК (pH 5,0) активність збільшується у 15 разів [6]. Схожий вплив на E_a спостерігається при інкубації 5-ЛО у присутності 0,1 мМ розчину додецилсульфату натрію при нейтральних значеннях pH. Додецилсульфат натрію схожий за будовою до ФК і вважається алостеричним регулятором 5-ЛО. Встановлено, що E_a інактивації ензиму зростає в 2,5–3,7 раза порівняно з результатами, одержаними при термоінкубації 5-ЛО у буферному розчині [9]. Це передусім свідчить про безпосередню взаємодію амфільних сполук з ензимом та конформаційні перебудови молекули 5-ЛО у присутності ФК і додецилсульфату натрію. Хоча вплив двох сполук на термодинамічний показник схожий, під час подальшого аналізу їхнього впливу на ензим спостерігається різниця у долі специфіч-

Значення констант швидкості термоінактивації (k) 5-ліпоксигенази та енергії активації денатурації ензиму E_a ($M \pm m$, $n = 3-4$)

Умови експерименту	Константа швидкості термоінактивації, $k \cdot 10^3, \text{c}^{-1}$					E_a , кДж/моль
	30 °C	40 °C	50 °C	60 °C	70 °C	
Без ФК рН 6,9	—	$0,0076 \pm 0,0002$	$0,23 \pm 0,02$	$0,76 \pm 0,02$	$2,76 \pm 0,02$	175,60
15 мкМ ФК рН 6,9	—	$0,0600 \pm 0,0047$	$0,53 \pm 0,03$	$6,10 \pm 0,07$	$73,90 \pm 2,60$	205,03
Без ФК рН 5,0	$0,175 \pm 0,030$	$0,25 \pm 0,04$	$0,43 \pm 0,05$	$1,10 \pm 0,05$	—	48,30
50 мкМ ФК рН 5,0	$1,367 \pm 0,070$	$5,60 \pm 0,30$	$41,56 \pm 7,10$	$96,33 \pm 5,95$	—	124,90

них продуктів, синтезованих 5-ЛО в їхній присутності. 5-ЛО з бульб картоплі конвертує ЛК в основному в 9-Е,Z-гідропероксид ЛК (приблизно 90% від загальної суми синтезованого гідропероксиду). Внесення 100 мкМ додецилсульфату натрію провокує зростання до 60% неспецифічних продуктів неензиматичного походження (вільних радикалів). Подібна за будовою, але природного походження, ФК у концентрації 30–80 мкМ під час порівняльного аналізу впливу інгібітора вільнорадикального процесу 4-гідрокси-ТЕМПО, навпаки, знижує рівень неензиматичних процесів на 15–50% при кислому рН, ніж у відсутності

ефектора [6]. Таким чином, цей фосфоліпід здатен підтримувати необхідну конформацію молекули протеїну в разі локальної зміни рН примембранного середовища протягом гомеостазу рослинної клітини, що підтверджується зміною значення E_a під впливом ФК. Загалом, зміна конформації ліпоксигеназ у присутності алостеричних регуляторів на сьогодні не досліджена.

Оскільки при цій концентрації ФК здатна утворювати міцели (критична константа міцелутворення для ФК при рН 5,0 – 0,13 мМ, а при рН 8,0 – 0,77 мМ [12]), взаємодія між ензимом та фосфоліпідом під час термоінкубації

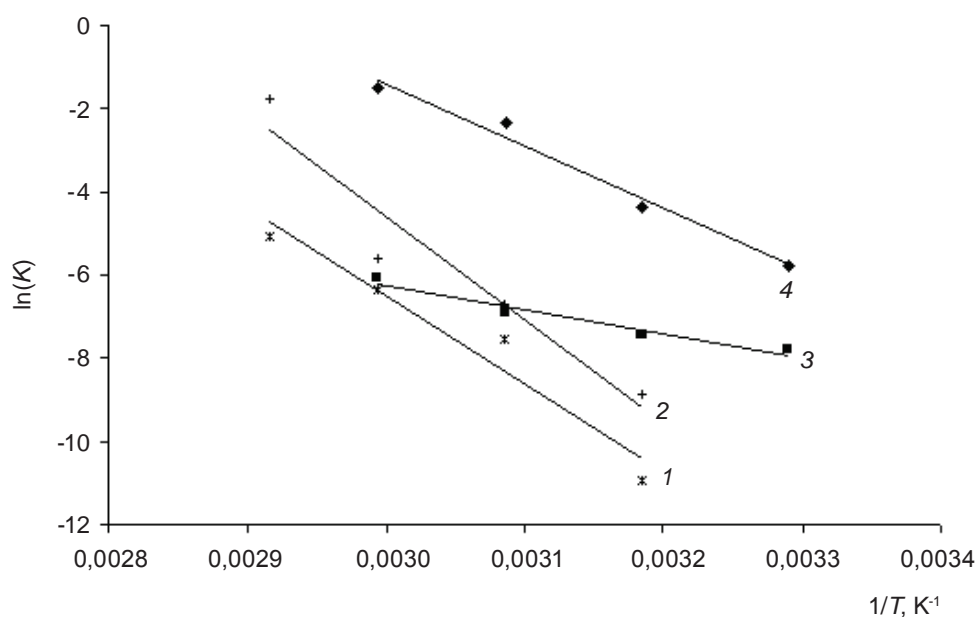


Рис. 2. Залежність логарифма константи швидкості термоінактивації 5-ліпоксигенази від оберненого значення температури при рН 6,9 та 5,0 без/з фосфатидною кислотою при концентрації 15 і 50 мкМ відповідно: 1 – без ФК, рН 6,9; 2 – 15 мкМ ФК, рН 6,9; 3 – без ФК, рН 5,0; 4 – 50 мкМ ФК, рН 5,0

відбувається на межі розподілу фаз: вода–міцела, де може виникати приповерхневий зсув значень рН. Відповідно будуть змінюватись заряд і конформація молекули протеїну та умови каталізу. Для визначення вірогідних змін рН на поверхні міцел ФК досліджено іонізацію ліпофільного індикатора бромтимолового синього (БТС). Крива іонізації БТС у присутності міцел ФК (рис. 3, крива 2) при рН 5,0–6,0 характеризується зсувом у кислу область рН приблизно на одиницю, що свідчить про залуження приповерхневого шару міцел; та у лужну область на ~ 0,5 одиниць при рН 7,5–8,5, що вказує на закислення порівняно з водним розчином (рис. 3, крива 1).

Вплив ФК на активність ензиму має різну ефективність, яка залежить від рН реакційної суміші. Так, при рН 5,0 ФК активує 5-ЛО у 15–20 разів, а при рН 6,9 тільки у 1,2 раза. Отже, ефект ФК, значною мірою визначається ступінню іонізації фосфоліпиду. При рН 6,9 та 5,0 молекули ФК знаходяться у частково депротонаній формі (рК ФК 3,8 та 8,5 [13]) і очевидно, що зі збільшенням депротонаної частки молекул ФК вплив на активність ензиму зменшується. З іншого боку, ізоелектрична точка 5-ЛО відповідає рН 4,94 [14], отже логічно припустити, що в умовах, близьких до ізоелектричної точки ензиму, частка іонізованих груп протеїну значно менша, ніж при нейтральному рН. Наведені факти свідчать про те,

що визначальними у взаємодії ензиму з алостеричним регулятором є гідрофобні зв'язки. Отже, вплив ФК на зміну E_a денатурації 5-ЛО можливий за рахунок гідрофобних взаємодій між фосфоліпидом та молекулою протеїну, які ведуть до конформаційних змін ензиму. Такий механізм взаємодії ФК з 5-ЛО пояснює здатність ензиму приєднувати від 3 до 4 молекул ефектора при рН 5,0 за недостатністю субстрату (позитивна кооперативність за ФК [6]). Раніше було показано подібний ефект ФК як алостеричного модифікатора для іншого ензиму – фосфоліпази С- γ 1, який також вважають гетерофазним [15]. Автори припускають, що ФК приєднується до С-кінцевого домену фосфоліпази С- γ 1, гомологічного регуляторному домену протеїнкінази С і є кальцій- та ліпідозв'язувальною ділянкою. Така структура молекули ліпази функціонально та за будовою подібна до збагаченого залишками гідрофобних амінокислот N-кінцевого домену ліпоксигенази [3,16], де, гіпотетично, локалізовано регуляторну ділянку.

Узагальнюючи, треба відзначити, що ФК суттєво змінює термостабільність 5-ліпоксигенази з бульб картоплі. Зокрема, у присутності цього фосфоліпиду відбувається зростання E_a денатурації при нейтральних та кислих рН розчину. Подібні зміни можуть свідчити про те, що взаємодія фосфоліпиду ФК із 5-ліпоксигеназою призводить до певних конформа-

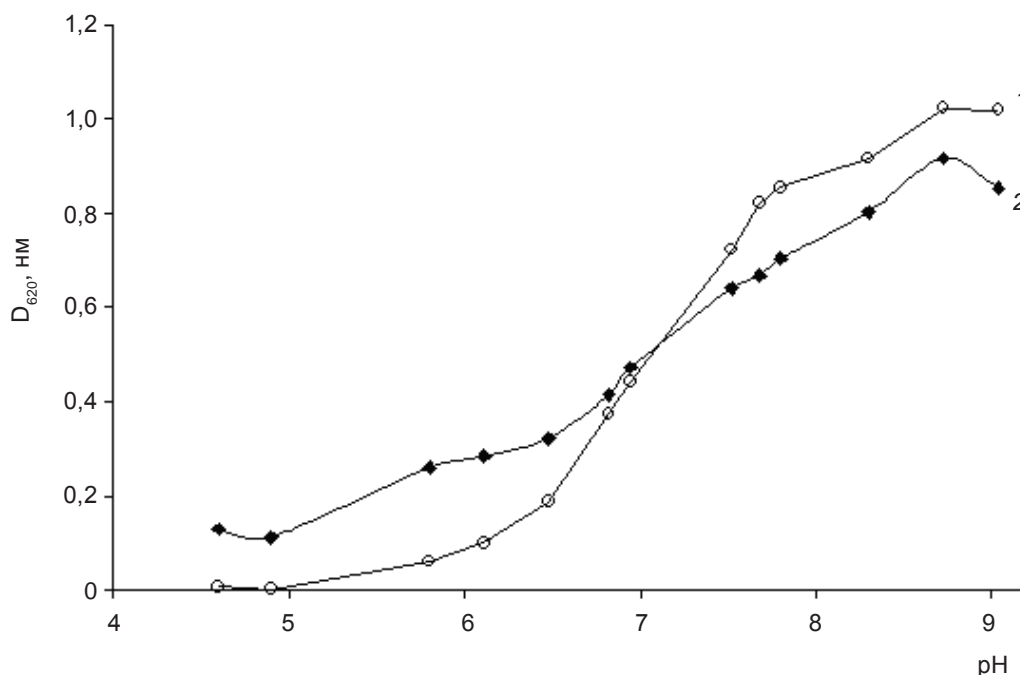


Рис. 3. Залежність іонізації бромтимолового синього від рН: 1 – водний розчин; 2 – міцели ФК

ційних змін у молекулі ензиму і, можливо, такий вплив відбувається за рахунок гідрофобних взаємодій. Одержані результати дають можливість спробувати пояснити механізм дії алостеричного регулятора на 5-ліпоксигеназу. У подальшому встановлення функціональних зв'язків окремих компонентів апарату ліпідного обміну (ліпоксигеназ, фосфоліпаз та їхніх метаболітів) дозволило б розширити існуючі уявлення про біологічне значення компартменталізації процесів метаболізму ліпідів у живій клітині.

**ТЕРМОИНАКТИВАЦИЯ
5-ЛИПОКСИГЕНАЗЫ КАРТОФЕЛЯ
И ВЛИЯНИЕ ФОСФАТИДНОЙ
КИСЛОТЫ НА ЭНЕРГИЮ
АКТИВАЦИИ ПРОЦЕССА
ДЕНАТУРАЦИИ**

*Т. Д. Скатерная, А. И. Харитоненко,
О. В. Харченко*

Институт биоорганической химии и
нефтехимии НАН Украины, Киев;
e-mail: skaternaya@bpci.kiev.ua

Исследовано влияние фосфатидной кислоты (ФК) – аллостерического активатора 5-липоксигеназы (5-ЛО) из клубней картофеля на термодинамические параметры термоинактивации энзима с целью определения структурно-функциональных связей отдельных компонентов аппарата липидного обмена: липоксигеназ и фосфолипидов мембран.

Установлено, что ФК существенно изменяет термостабильность 5-ЛО, а именно, в присутствии данного фосфолипида происходит увеличение энергии активации E_a денатурации энзима в несколько раз. Подобные изменения могут свидетельствовать о том, что взаимодействие фосфолипида ФК с 5-ЛО приводит к некоторым конформационным изменениям энзима, возможно обусловленным гидрофобными взаимодействиями. Полученные результаты дают возможность объяснить механизм действия ФК как аллостерического активатора 5-ЛО, способного замещать молекулы субстрата в местах их связывания и повышающего уровень образования специфических продуктов 5-липоксигеназного окисления линолевой кислоты.

Ключевые слова: 5-липоксигеназа, линолевая кислота, аллостерический эффектор, фосфатидная кислота, термоинактивация.

**THERMOINACTIVATION OF
POTATO 5-LIPOXYGENASE AND
EFFECT OF PHOSPHATIDIC
ACID ON ACTIVATION
ENERGY OF DENATURATION**

*T. D. Skaternaya, G. I. Kharitonenko,
O. V. Kharchenko*

Institute of Bioorganic Chemistry and
Petrochemistry, National Academy
of Sciences of Ukraine;
e-mail: skaternaya@bpci.kiev.ua

S u m m a r y

The investigation aim was to establish the structural-functional relations of individual lipid metabolism components: enzymes – lipoxygenases and membrane phospholipids. Influence of phosphatidic acid (PA)– allosteric activator of potato tuber 5-lipoxygenase (5-LO) – on thermoinactivation thermodynamic parameters of enzyme was studied.

It was established that PA changes essentially the 5-LO thermostability, namely activation energy E_a of enzyme denaturation increases several times in this phospholipid presence. Such changes can evidence that PA interaction with 5-LO leads to conformational changes of enzyme probably due to hydrophobic interactions. Obtained results give a possibility to interpret the action mechanism of PA as 5-LO allosteric activator, which can displace the substrate molecules in binding sites and increase the level of formation of specific products of linoleic acid oxygenation by 5-LO.

Key words: 5-lipoxygenase, linoleic acid, allosteric effector, phosphatidic acid, thermoinactivation.

1. *Liavonchanka A., Feussner I.* // J. Plant Physiology. – 2006. – **163**. – P. 348–357.
2. *Grechkin A. N., Tarchevsky I. A.* // Russ. J. Plant Physiol. – 1999. – **46**, N 1. – P. 132–142.
3. *Hornig C., Albert D., Fisher L. et al.* // J. Biol. Chem. – 2005. – **280**, N 29. – P. 26913–26921.
4. *Butovich I. A., Babenko V. M., Livarchuk L. V. et al.* // Biochem. – 1991. – **56**, N 12. – P. 1077–1081.
5. *Kharitonenko G. I., Kharchenko O. V.* // Biopolymers and Cell. – 2008. – **24**, N 3. – P. 254–259.
6. *Скатерна Т. Д., Харченко О. В.* // Укр. біохім. журн. – 2008. – **80**, № 3. – С. 21–29.
7. *Pand A. H., Shan Qin, Tatulian S. A.* // Biophys. J. – 2005. – **88**. – P. 4084–4094.

8. *Anthon G. E., Sekin Y., Watanabe N., Barrett D. M.* // *J. Agric. Food Chem.* – 2002. – **50**. – P. 6153–6159.
9. *Rodrigo D., Jolie R., Loey A. V., Hendrickx M.* // *Eur. Food Res. Technol.* – 2006. – **222**. – P. 636–642.
10. Харитоненко Г. І., Скатерна Т. Д., Мельник А. К. та ін. // *Укр. біохім. журн.* – 2008. – **80**, № 3. – С. 31–39.
11. *Park K-H., Kim Y-M., Lee C-W.* // *J. Agric. Food Chem.* – 1988. – **36**. – P. 1012–1015.
12. *King M., Marsh D.* // *Biochemistry.* – 1987. – **26**. – P. 1224–1231.
13. *Abramson M. B., Katzman R., Wilson C. E., Gregor H. P.* // *J. Biol. Chem.* – 1964. – **239**, N 12. – P. 4066–4072.
14. *Mulliez E., Leblanc J.-P., Girerd J.-J. et al.* // *BBA.* – 1987. – **916**, N 1. – P. 13–23.
15. *Jones G. A., Carpenter G.* // *J. Biol. Chem.* – 1993. – **268**, N 28. – P. 20845–20850.
16. *Kulkarni S., Das S., Funk C. D. et al.* // *Ibid.* – 2002. – **277**, N 15. – P. 13167–13174.

Отримано 05.08.2009