

ture. The isolation steps involve geparine-agarose chromatography, Lichroprep RP 18 one and the electrophoresis in 20 % polyacrylamide gel under denaturation conditions followed by electroelution of the desired product from gel.

Being an exact copy of deoxyribotemplate the ribooligonucleotide gave the yield of 1.0-1.5  $U_{260}$  on 5.0  $U_{260}$  of the template.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Денисова Л. Я., Загребельный С. Н., Пустошилова Н. М. Изучение матричной активности пиримидиновых дезоксирибоолигонуклеотидов в системе РНК-полимеразы *E. coli* // Молекуляр. биология.— 1974.— 8, № 5.— С. 643—650.
2. Исследование матричных свойств декадезоксинуклеотида d(pCCACGAAACC) в системе РНК-полимеразы *Escherichia coli* / А. Г. Бадашкева, Л. Я. Денисова, С. Н. Загребельный и др. // Там же.— 1978.— 12, № 2.— С. 327—333.
3. Транскрипция синтетических олигонуклеотидов / Н. М. Белова, Л. Я. Денисова, С. Н. Загребельный и др. // Там же.— 1979.— 13, № 4.— С. 845—853.
4. Непрерывное копирование коротких матриц ДНК-зависимой РНК-полимеразой / Л. Я. Денисова, С. Н. Загребельный, И. В. Кутявин, Н. М. Пустошилова // Докл. АН СССР.— 1982.— 267, № 2.— С. 475—478.
5. Автоматический синтез олигодезоксирибонуклеотидов фосфитамидным методом на установке «Виктория-4М» / С. М. Грязнов, В. В. Горн, В. Ф. Зарытова и др. // Изв. Сиб. отд-ния АН СССР, Сер. хим. наук.— 1987.— 2, № 1.— С. 119—123.
6. Сравнительные характеристики методов синтеза олигодезоксирибонуклеозид-3'-фосфатов / Е. М. Волков, С. М. Грязнов, Н. Ф. Крышечкая и др. // Химия природ. соединений.— 1986.— № 2.— С. 228—234.
7. Синтез кодонов лейцина и их использование для изучения кодового соответствия тРНК<sup>Leu</sup> / А. Г. Веняминашова, Г. В. Овчаренко, М. Н. Репкова, Л. А. Франк // Молекуляр. биология.— 1984.— 18, № 5.— С. 1376—1379.
8. Maniatis T., Jeffrey A., van de Sande H. Chain length determination of small double- and single-stranded DNA molecules by polyacrylamide gel electrophoresis // Biochemistry.— 1975.— 14, N 17.— P. 3787—3794.
9. Richardson Ch. C. Polynucleotide kinase exchange reaction // Ibid.— 1965.— 54, N 1.— P. 158—165.
10. Donis-Keller H., Maxam A. M., Gilbert W. Mapping adenines, guanines and pyrimidines in RNA // Nucl. Acids Res.— 1977.— 4, N 8.— P. 2527—2538.
11. Nath K., Hurwitz J. Covalent attachment of ribonucleotides at 3-hydroxyl ends of deoxyribonucleic acid catalysed by deoxyribonucleic acid dependent ribonucleic acid polymerase of *Escherichia coli* // J. Biol. Chem.— 1974.— 249, N 9.— P. 2605—2615.

НИКТИ БАВ, Бердск

Получено 25.08.89

Ин-т биоорг. химии Сиб. отд-ния АН СССР, Новосибирск

УДК 577.17.049

© А. А. Ккладзе, В. Г. Биркая, Э. М. Ломидзе,  
Д. Р. Мопаселдзе, 1990

#### ИССЛЕДОВАНИЕ pH-ЗАВИСИМЫХ СТРУКТУРНЫХ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ $M_4$ ПРИ ДЕЙСТВИИ ИОНОВ ЦИНКА

Методами микрокалориметрии и УФ-спектроскопии установлено, что на молекуле ЛДГ  $M_4$  существует один специфический центр связывания для ионов цинка. По данным кругового дихроизма, при связывании ферментом иона цинка не наблюдается изменений во вторичной структуре, хотя при этом изменяются кинетические параметры фермента.

**Введение.** Известно, что высокая эффективность и селективность ферментов в качестве катализаторов обусловлена особенностями их строения. Связывание ферментов с низкомолекулярными лигандами, в частности с ионами металлов, имеет, как правило, специфический характер и значительно влияет на их кинетические параметры. Одной из причин, определяющих кинетическое поведение олигомерных ферментов, является характер ассоциации составляющих их субъединиц. В этом плане принципиально важно изучить вопрос о влиянии на ассоциацию — диссоциацию лактатдегидрогеназы (ЛДГ) эндогенно связанных

ионов металлов, которое может быть связано с изменением конформации, значений рК ионогенных групп, контролирующих активность, константы Михаэлиса и т. д. Принимая во внимание, что ионы цинка стабилизируют четвертичную структуру многих ферментов [1] и что концентрация их в процессе клеточного цикла подвергается циклическим колебаниям [2], как и активность гликолиза [3, 4], в данной работе исследовали влияние ионов цинка на структуру и функцию ЛДГ М<sub>4</sub>.

**Материалы и методы.** ЛДГ из скелетных мышц свиньи (изоформа М<sub>4</sub>) выделяли по методу Екаи [5] с дальнейшей очисткой на ДЭАЭ-целлюлозе. Полученный препарат ЛДГ М<sub>4</sub> хранили в сульфате аммония и перед экспериментом обессоливали на колонке с сефадексом G-50. По обычным электрофоретическим критериям препарат был гомогенен. ЛДГ М<sub>4</sub> с ионами цинка получали в 10 мМ фосфатном буфере при рН 7,5, добавляя соль цинка (ZnSO<sub>4</sub>) к ферменту в требуемом соотношении. Затем инкубировали 30 мин при 25 °С и использовали в дальнейших экспериментах. Необходимо отметить, что анион SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> в исследуемых концентрациях не влиял на активность ЛДГ М<sub>4</sub> и получаемый препарат после обессоливания на колонке с сефадексом G-50 не содержал ионов цинка. Последние определяли импульсным спектрофотометром, основанным на применении УВЧ-индуктивно связанной плазмы пониженного давления в качестве оптического источника света в атомно-эмиссионном элементном анализе [6]. Концентрацию ЛДГ М<sub>4</sub> определяли спектрофотометрически, используя коэффициент экстинкции (1 г/л)  $\epsilon_{280} = 1,29$  [5], концентрацию NADH — по поглощению при 340 нм ( $\epsilon_{340} = 6220$ ). Кинетику восстановления пирувата регистрировали по изменению оптической плотности при 340 нм на спектрофотометре «Uliscan-1800» (Англия). Начальную скорость реакции определяли по наклону касательной к исходному отрезку кинетической кривой, регистрируемой в течение первых 30 с после запуска реакции [7]. Кинетические параметры реакции ( $V_{max}$  и  $K_m$ ) находили с помощью преобразования Лайнувера—Берка и метода наименьших квадратов. Плавление ЛДГ М<sub>4</sub> исследовали на микрокалориметре [8]. Спектры кругового дихроизма измеряли на спектрополяриметре Jasco-500A (Япония).

**Результаты и обсуждение.** На рис. 1 приведена зависимость начальной скорости реакции восстановления пирувата от рН для растворов ЛДГ М<sub>4</sub>, содержащих и не содержащих ионов цинка. Из этих данных видно, что для Zn/ЛДГ наблюдается снижение активности фер-

Таблица 1

Действие ионов цинка на структуру ЛДГ М<sub>4</sub> по данным микрокалориметрии (0,4 % -ный раствор ЛДГ М<sub>4</sub> в 0,1 М Na-фосфатном буфере)

The effect of zinc ions on the LDH-M<sub>4</sub> structure. Calorimetric data (0,4 % LDH M<sub>4</sub> solution in 0.1 M Na-phosphate buffer)

рН	Образец	T <sub>m</sub> , °C (±0,1)	T, °C (±0,05)	Q, кал/грамм (±0,2)
6,50	ЛДГ	58,0	2,50	3,8
	Zn/ЛДГ=1	58,0	2,50	3,4
	Zn/ЛДГ=4	58,0	4,00	2,0
7,50	ЛДГ	56,8	3,20	2,3
	Zn/ЛДГ=1	57,2	2,80	2,9
	Zn/ЛДГ=2	57,2	3,20	2,5
	Zn/ЛДГ=4	56,0	3,60	1,9
	Zn/ЛДГ=10	55,6	5,20	1,5
8,25	ЛДГ	55,0	2,70	2,8
	Zn/ЛДГ=1	56,0	2,70	2,4
	Zn/ЛДГ=4	51,0; 56,0	—	—

мента. Причем при связывании одного иона цинка ферментом снижение активности наблюдается в диапазоне рН 7,00—8,25, а при соотношении Zn/ЛДГ=4 эта область расширяется и достигает значения рН 6,0. Наблюдаемое значение рК ионогенной группы, контролирующей активность фермента, сдвигается с 7,55 до 7,75 при связывании

ферментом ионов цинка. Сдвигом рН-зависимости, однако, не ограничиваются изменения, происходящие с ЛДГ М<sub>4</sub> при связывании ионов цинка. Так, в табл. 1 суммированы результаты микрокалориметрических исследований. Как видно из представленных данных, при рН 6,5 параметры плавления ЛДГ и Zn/ЛДГ=1 не различаются, в то же время для соотношения Zn/ЛДГ=4 наблюдается увеличение интервала плавления и уменьшение теплоты плавления. При рН 7,50 и 8,25 связывание одного иона цинка приводит к увеличению термостабильности

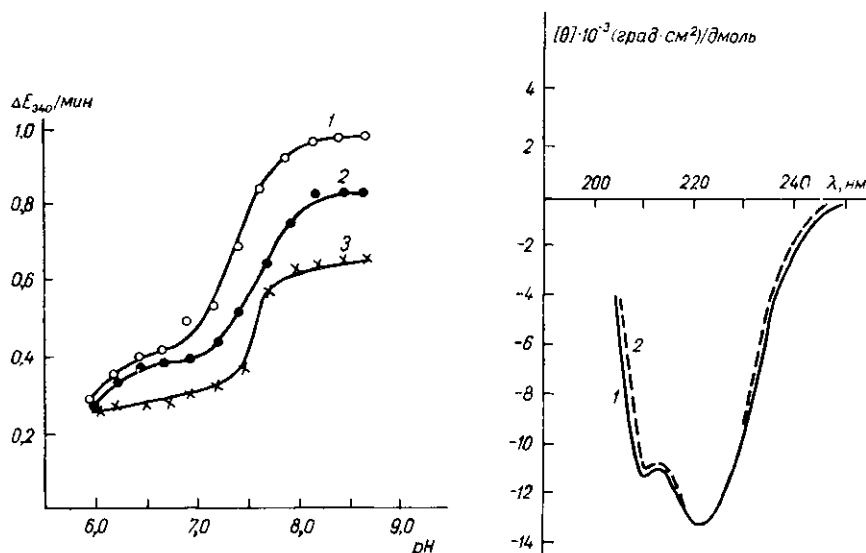


Рис. 1. Зависимость скорости восстановления пирувата от рН (0,2 М Na-фосфатный буфер; концентрация NADH  $2 \cdot 10^{-4}$  М, пирувата — 20 мМ, ЛДГ — 1 мкг/мл): 1 — ЛДГ; 2 — Zn/ЛДГ=1; 3 — Zn/ЛДГ=4

Fig. 1. pH dependence of pyruvate rate reduction (0.2 M Na-phosphate buffer; concentration of NADH  $2 \cdot 10^{-4}$  M, pyruvate — 20 mM, LDH — 1  $\mu\text{g/ml}$ ): 1 — LDH; 2 — Zn/LDH-1; 3 — Zn/LDH-4

Рис. 2. Спектр кругового дихроизма ЛДГ и Zn/ЛДГ (0,2 М Na-фосфатный буфер, рН 8,25; концентрация фермента 0,2 г/л): 1 — ЛДГ; 2 — Zn/ЛДГ=1; 3 — Zn/ЛДГ=2; 4 — Zn/ЛДГ=4; 5 — Zn/ЛДГ=10

Fig. 2. A spectrum of circular dichroism of LDH and Zn/LDH (0.2 M Na-phosphate buffer, enzyme concentration — 0.27 g/l) 1 — LDH; 2 — Zn/LDH-1; 3 — Zn/LDH-2; 4 — Zn/LDH-4; 5 — Zn/LDH-10

плавления по сравнению с контролем, причем с увеличением рН наблюдается увеличение данного эффекта до одного градуса (56,8 и 57,2 °С при рН 7,5 и 55,0 и 56,0 °С при рН 8,25). Дальнейшее же связывание ионов цинка приводит к обратному эффекту: уменьшению теплоты плавления и увеличению его интервала. Причем при рН 8,25 для Zn/ЛДГ=4 на кривых теплоемкости наблюдаются два пика теплопоглощения (т. е. существуют два различных домена с различной термостабильностью). Данные наблюдения указывают на то, что на молекуле ЛДГ М<sub>4</sub>, вероятно, существуют два различных центра связывания ионов цинка, причем центр связывания с большей константой связывает один ион цинка и с увеличением рН данная константа увеличивается. Следует отметить, что при исследовании действия ионов кобальта и никеля на ЛДГ М<sub>4</sub> не наблюдается изменений, характерных для действия одного иона цинка. Связывание одного иона кобальта или никеля уменьшает термостабильность фермента (табл. 2). Следовательно, присоединение кобальта и никеля, вероятно, происходит в центре связывания с низким значением рК, т. е. на молекуле ЛДГ М<sub>4</sub> существует один специфический центр связывания для ионов цинка. В связи с тем, что ЛДГ М<sub>4</sub> получают кристаллизацией в сульфате аммония при рН 6,2—6,5, а по нашим данным при такой величине рН не происходит специфического связывания ионов цинка ферментом, необ-

ходимо было исследовать, как связывание одного иона цинка влияет на кинетические и структурные параметры фермента.

Так, была исследована зависимость скорости восстановления пирувата от концентрации ЛДГ  $M_4$  при различных значениях pH. Из обратной зависимости в координатах Лайнуивера—Берка были получены значения константы Михаэлиса (табл. 3), откуда видно, что для  $Zn/LDH$  наблюдается резкое увеличение константы Михаэлиса при pH 8,0—8,5. На кривой зависимости  $\lg S$  от  $\lg[V/(V_m - V)]$  для  $Zn/LDH$  не обнаружено кооперативности во всем исследованном интервале pH (получены прямые с коэффициентом Хилла, равным единице), что говорит о кинетической эквивалентности активных центров фермента по отношению к пирувату.

Таблица 2

Действие ионов кобальта и никеля на структуру ЛДГ  $M_4$  по данным микрокалориметрии (0,4 %-ный раствор ЛДГ  $M_4$  в 0,1 М Na-фосфатном буфере, pH 7,5)

The effect of cobalt and nickel ions on the LDH  $M_4$  structure. Calorimetric data (0,4 % LDH  $M_4$  solution in 0,1 M Na-phosphate buffer, pH 7,5)

Образец	$T_m$ , °C ( $\pm 0,1$ )
ЛДГ	56,8
Co/ЛДГ=1	56,3
Co/ЛДГ=4	55,6
Ni/ЛДГ=1	56,2
Ni/ЛДГ=4	55,5

Таблица 3

Значения константы Михаэлиса для пирувата при различных pH (0,2 М Na-фосфатный буфер; концентрация NADH —  $2 \cdot 10^{-4}$  М, пирувата — 0,02—0,14 мМ, ЛДГ — 1 мкг/мл)

The Michaelis-Menten constants for pyruvate at various pH (0,2 M Na-phosphate buffer; concentration NADH —  $2 \cdot 10^{-4}$  M, pyruvate — 0,02—0,14 mM, LDH — 1  $\mu$ g/ml)

pH	$K_m$ , мМ ( $\pm 0,05$ )	
	ЛДГ	$Zn/LDH=1$
6,50	0,16	0,13
7,00	0,26	0,14
7,50	0,27	0,19
8,00	0,29	0,95
8,25	0,29	1,55
8,50	0,36	1,98

Таким образом, совокупность приведенных данных указывает, что связывание одного иона цинка ферментом приводит к изменению его кинетических, так и структурных свойств, хотя вторичная структура, как было показано методом кругового дихроизма, при этом не меняется, т. е. изменения затрагивают третичную или четвертичную структуру фермента (рис. 2).

Из литературы известно, что характерный для отдельных тканей стационарный уровень активности ЛДГ определяется, в основном, различиями в скорости деградации фермента [9]. Показано, что изоформа  $M_4$  более подвержена протеазному влиянию, чем изоформа  $H_4$ . Однако, по нашим данным, с учетом стабилизирующего действия ионов цинка на структуру  $M_4$  можно предположить, что увеличение периода полужизни ЛДГ  $M_4$  приведет к увеличению количества данной изоформы фермента и, как результат, к другому уровню стационарной активности ЛДГ, характерному для той клеточной микросреды и для такого клеточного процесса, которому свойствен высокий уровень содержания ионов цинка, т. е. ионы цинка могут влиять на общий уровень активности ЛДГ ткани.

#### STUDIES IN pH-DEPENDENT STRUCTURAL AND FUNCTIONAL PROPERTIES OF LACTATE DEHYDROGENASE IN THE PRESENCE OF ZINC IONS

A. A. Kiladze, V. G. Birkaya, E. M. Lomidze, J. R. Monaselidze

Institute of Physics,  
Academy of Sciences of the Georgian SSR, Tbilisi

#### Summary

The effect of zinc, cobalt and nickel ions on the LDH structure and function was studied. Calorimetric data have revealed essentially different melting character of LDH and

LDH bound with zinc, cobalt, and nickel ions. It is noteworthy that one zinc ion binding is specific for LDH M<sub>4</sub>. It is shown that zinc ion binding causes the changes in the LDH kinetic properties, no changes in LDH secondary structure occurring.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Vallee B. L., Galdes A. The metallobiochemistry of zinc enzymes // Adv. Enzymol. and Relat. Areas. Mol. Biol.— 1984.— 56.— P. 283—430.
2. Klevecz R. R., Kapp L. M. Intermittent DNA synthesis and periodic expression of enzyme activity in the cell cycle of WT-38 // Ibid. 1973.— 58, N 3.— P. 564—573.
3. Boiteux L., Goldbeter A., Hess B. Control of oscillating glycolysis of yeast by stochastic, periodic and steady source of substrate. A model and experimental study // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1975.— N 12.— P. 3829—3833.
4. Hess B., Goldbeter A., Lejeune R. Temporal, spatial and functional order in regulated biochemical and cellular systems // Adv. Chem. Phys.— 1978.— 38, N 2.— P. 363—413.
5. Jecsai G. Crystalline lactic dehydrogenase from pig skeletal muscle // Acta phys. Acad. sci. hung.— 1961.— 20.— P. 339—341.
6. Бресадзе В. Г. УВЧ-индуцированная плазменная эмиссионная спектроскопия // Новые физ. методы в биол. исследованиях.— М.: Наука, 1987.— С. 33—45.
7. Сабурова Е. А., Маркович Д. С., Гольдштейн Б. И. Исследование pH-зависимости структурных и функциональных свойств лактатдегидрогеназы (M<sub>4</sub>). О косвенной кооперативности в лактатдегидрогеназе // Молекуляр. биология.— 1977.— 11, № 2.— С. 332—344.
8. Бакардзе И. Г., Монаселидзе Д. Р. Прецизионный дифференциальный микрокалориметр // Измерительная техника.— 1971.— № 2.— С. 58—60.
9. Nadal-Ginard B. Regulation of lactate dehydrogenase levels in the mouse // J. Biol. Chem.— 1978.— 253, N 1.— P. 170—177.

Ин-т физики АН ГССР, Тбилиси

Получено 16.06.89

УДК 544.344

© И. В. Пехник, М. Ю. Селищева, А. А. Серейская, 1990

#### ВЛИЯНИЕ ИОННОЙ СИЛЫ НА ФЕРМЕНТАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ ТРОМБИНА

*Исследовано влияние ионной силы среды на активность тромбина (ТР) при действии его на фибриноген (ФГ) и низкомолекулярный субстрат. Сделан вывод о том, что условия низкой ионной силы ( $I=0,05-0,07$ ) благоприятны для специфического взаимодействия ТР с ФГ, не затрагивающего активного центра фермента.*

**Введение.** По современным представлениям, в протеолизе фибриногена тромбином, кроме активного, участвует и дополнительный центр (ДЦ) — особый элемент молекулы фермента, ответственный за узнавание и связывание высокомолекулярных субстратов [1]. До настоящего времени ДЦ остается структурой гипотетической, хотя и имеются косвенные экспериментальные данные, свидетельствующие о его существовании и в какой-то мере характеризующие его [2]. Предполагается, что ДЦ содержит кластер положительно заряженных аминокислотных остатков, которые взаимодействуют с отрицательно заряженными остатками участка Аα-цепи ФГ, несколько удаленного от расщепляемой связи. Это взаимодействие приводит к конформационным изменениям фермента и субстрата, выражающимся в том, что расщепляемая связь занимает оптимальное для акта катализа положение по отношению к активному центру фермента [1, 3, 4]. При гидролизе низкомолекулярных субстратов ДЦ тромбина в реакцию не вовлекается; ориентация расщепляемой связи зависит от соответствия их структуры строению вторичных связывающих участков активного центра фермента. Родственные тромбину пищеварительные протеиназы широкого спектра действия подобным ДЦ регуляторным элементом не обладают [4].