

Фосфатидилхолін і фосфатидилінозит – алостеричні регулятори 5-ліпоксигенази з бульб картоплі

Г. І. Харитоненко, О. В. Харченко

Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України
Вул. Мурманська, 1, Київ, 02094, Україна
anna@bpci.kiev.ua

*Визначено кінетичні константи реакції окиснення лінолевої кислоти за присутності очищеної 5-ліпоксигенази з бульб *Solanum tuberosum*. Показано, що гідрофільна та гідрофобна форми ферменту за умов міцелярної системи проявляють позитивну кооперативність відносно лінолевої кислоти. Приєднання фосфатидилхоліну або фосфатидилінозиту до ліпоксигенази призводить до вивільнення субстрату з ферменту і, таким чином, до зменшення або збільшення швидкості реакції відповідно. Отримані результати свідчать про алостеричний механізм регуляції активності 5-ліпоксигенази зазначеними фосфоліпідами.*

Ключові слова: 5-ліпоксигеназа, фосфоліпіди, алостерія.

Вступ. Ліпоксигенази (лінолеат:кисень оксидоредуктази КФ 1.13.11.12) – це поширені ферменти ліпідного обміну, які каталізують діоксигенацію 1,4-цис,цис-пентадієнового фрагмента поліненасичених жирних кислот з утворенням відповідних гідропероксидів. Дана реакція є ключовою у синтезі низки біологічно активних сполук, залучених до регуляції росту і старіння клітини та забезпечення захисних реакцій організму на дію біотичних і абіотичних факторів. З ліпоксигеназною активністю пов'язують також інтенсифікацію перекисного окиснення мембранних структур на початкових етапах апоптозу та гіперчутливої відповіді клітини на пошкодження [1]. Ключове місце згаданих ферментів у метаболізмі рослинних і тваринних клітин, а також потужна регуляторна дія продуктів ліпоксигеназного каскаду обумовлюють актуальність дослідження механізмів регуляції активності ліпоксигеназ.

У клітині основна частина поліненасичених жирних кислот локалізована у складі мембранних структур та ліпопротеїнових комплексів; отже, транслокація ферменту з цитозолу на поверхню мембрани є суттєвим етапом у регуляції ліпоксигеназної активності та кількості метаболітів даного ферментативного каскаду. Згідно із сучасними поглядами, сорбція ферменту забезпечується декількома чинниками, серед яких важливе місце посідає взаємодія ліпоксигенази з ліпідною складовою мембранних структур [2, 3]. У попередніх роботах показано, що поширені фосфоліпіди (ФЛ) – фосфатидилхолін (ФХ) та фосфатидилінозит (ФІ) в концентраціях 0,01–0,4 мМ за умов міцелярної системи здатні відповідно зменшувати або збільшувати стаціонарну швидкість окиснення лінолевої кислоти (ЛК) у присутності 5-ліпоксигенази з бульб *Solanum tuberosum* (5-ЛЮ) [4].

Мета даної роботи – дослідити механізм впливу ФХ та ФІ на перебіг 5-ліпоксигеназного каталізу за умов міцелярної системи.

Матеріали і методи. В роботі використано ЛК, Lubrol PX, Brij-99 («Sigma», США); етилендіамінтетраоцтову кислоту (ЕДТА) («Reanal», Угорщина); трис-(гідроксиметил)амінометан («Boehringer», Німеччина); акриламід, N,N-метиленбісакриламід, N,N,N,N-тетраметилендіамід, персульфат амонію, ФХ, бромтимоловий синій («Serva», Німеччина); бутил-сефароза CL-4B («Pharmacia», Швеція); DEAE-Тоуорpearl («Тоуо-Soda», Японія), ФІ з дріжджів виробництва Харківського заводу бакпрепаратів. Решта реактивів мали кваліфікацію «х. ч.» або «ос. ч.».

5-ЛО виділяли з бульб картоплі сорту «Луговська» за модифікованим методом [5]. Розчин білка, одержаний в результаті екстракції, висолювання 25–50 %-м сульфатом амонію та діалізу, наносили на колонку (2,5 15 см) з DEAE-Тоуорpearl, врівноважену буфером (0,025 М трис-НСІ, рН 7,5, 20 %-й гліцерин). Білки елюювали лінійним градієнтом концентрації NaCl (0–0,25 М, $V = 150$ мл) у тому ж буферному розчині зі швидкістю 0,15 мл/хв. Ферментативну активність відмічено у двох піках (при 0,13 та 0,17 М NaCl). Фракції з найбільшою питомою активністю об'єднували і наносили на колонку з бутил-сефарозою (1 10 см), врівноважену 0,025 М трис-НСІ буферним розчином, рН 7,5, що містив 0,5 М NaCl та 20 %-й гліцерин. Елюцію проводили буферним розчином попереднього складу зі швидкістю 0,15 мл/хв. Після виходу першого піка ферментативної активності елюцію продовжували, використовуючи 0,025 М трис-НСІ буфер, рН 7,5. Усі етапи очищення здійснювали за температури 4 °С. На кожному етапі визначали активність ферменту та концентрацію білка за методом Бредфорда [6]. Препарати ферменту зберігали при температурі –17 °С без помітної втрати активності протягом півроку. Чистоту отриманих препаратів 5-ЛО оцінювали методом електрофорезу у 8 %-му поліакриламідному гелі за нативних умов [7].

Активність ферменту визначали спектрофотометрично, реєструючи збільшення з часом оптичної густини реакційної суміші при $\lambda = 235$ нм, що відповідає максимальному поглинанню спряженого дієнового хромофору в молекулі гідропероксиду (молярний коефіцієнт екстинкції $23000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [8].

Фосфоліпіди (ФХ або ФІ) розчиняли в 1 %-му розчині Lubrol PX. Стандартна реакційна суміш загальним об'ємом 2,5 мл містила 0,1 М натрій-фосфатний буферний розчин (рН 6,3), 50 мкл 1 %-го Lubrol PX з необхідною кількістю ФЛ або без них та 5–100 мкл 2,5 мМ ЛК. Реакцію ініціювали додаванням 2,5 мкг гідрофільної або 20 мкг гідрофобної форми 5-ЛО. Вимірювання проводили в термостатованій комірці за температури 25 °С. Активність ферменту оцінювали за значенням стаціонарної швидкості реакції (V_{st}), яку представляли як середнє арифметичне трьох вимірів з відхиленням не більше 5 %.

Константу іонізації бромтимолового синього визначали спектрофотометрично за поглинанням при 620 нм в інтервалі величини рН 4,5–10,0 [9, 16]. Концентрація індикатора становила 0,00045 %. Вимірювання проводили за температури 23 ± 1 °С.

Результати і обговорення. В результаті запропонованої схеми очищення, яка передбачає екстракцію, висолювання 25–50 %-м сульфатом амонію, діаліз, іонообмінну хроматографію на DEAE-Тоуорpearl (рис. 1, а) та гідрофобну хроматографію на бутил-сефарозі (рис. 1, б), отримано дві фракції ферменту, що суттєво різняться за спорідненістю до гідрофобного носія. Результати очищення 5-ЛО за цією схемою наведено у табл. 1.

За даними електрофорезу ступінь очищення гідрофобної та гідрофільної форми 5-ЛО становить 74 та 87 % відповідно.

Кінетичними дослідженнями встановлено, що гідрофобна форма 5-ЛО має значно нижчу питому активність, ніж гідрофільна, але за умов термічної денатурації гідрофобної форми ферменту збільшення в області оптичного поглинання продуктів реакції не спостерігалось, що виключає неферментативний перебіг процесу. Залежності стаціонарної швидкості від концентрації ЛК для обох фракцій мають сигмоїдну форму (рис. 2), що характерно для ферментів з позитивною кооперативністю дії стосовно субстрату. Враховуючи це, кінетичні константи даних реакції обраховано за рівнянням Хіла:

$$V_{st} = \frac{V_{\max} [S]_0^h}{[S]_{0,5}^h + [S]_0^h},$$

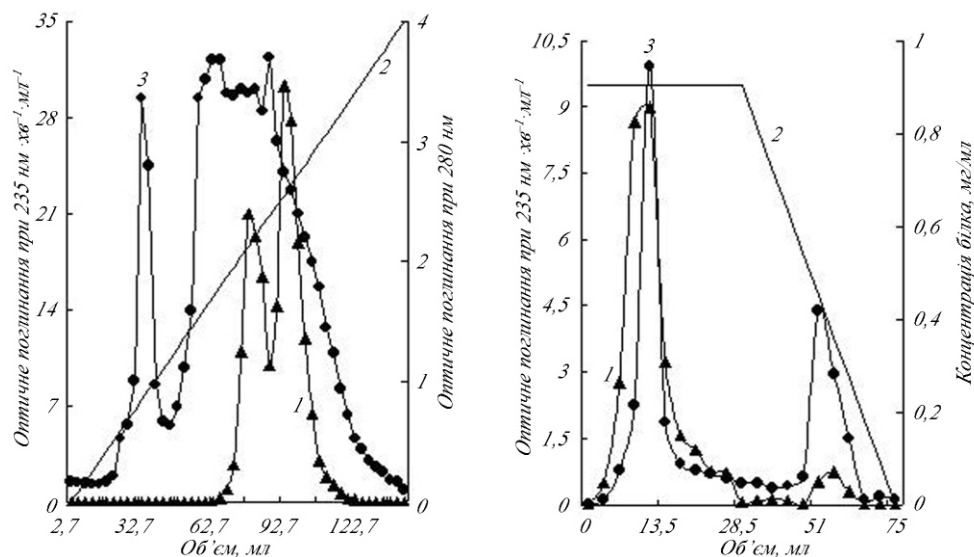


Рис. 1. Хроматограма 5-ліпоксигенази з бульб картоплі на DEAE-Тоуорpearl, рН 7,5 (а) та на бутил-сефарозі, рН 7,5 (б): 1 – активність 5-ліпоксигенази; 2 – градієнт концентрації NaCl; 3 – оптичне поглинання при 280 нм

Таблиця 1
Схема очищення 5-ліпоксигенази із бульб картоплі

Стадія очищення	Загальна активність, ммоль/хв	Загальна концентрація білка, мг	Питома активність, ммоль/хв на 1 мг білка	Ступінь очищення	Вихід, %
Екстракція	99,8	867,0	0,12	1,00	100
Висолування 25–55 %-м сульфатом амонію	64,5	534,5	0,12	1,05	64,6
Діаліз	45,4	372,6	0,12	1,06	45,5
Хроматографія на DEAE-Тоуорpearl, рН 7,5	14,5	40,3	0,36	3,12	14,5
Хроматографія на бутил-сефарозі, рН 7,5, гідрофільна фракція	0,9	0,8	1,20	10,43	0,9
Хроматографія на бутил-сефарозі, рН 7,5 гідрофобна фракція	0,2	3,6	0,06	0,48	0,2

де V_{st} – стаціонарна швидкість реакції; V_{max} – максимальна швидкість реакції; $[S]_0$ – концентрація субстрату; $[S]_{0,5}$ – концентрація субстрату, за якої $V_{st} = 0,5 V_{max}$; h – коефіцієнт Хіла [10]. Результати розрахунків представлено у табл. 2. Згідно із значеннями коефіцієнта Хіла, під час каталітичного циклу з гідрофільною та гідрофобною формами 5-ЛО зв'язуються чотири і дві молекули ЛК відповідно.

Подібний механізм регуляції продемонстровано також для ліпоксигеназ, одержаних з інших джерел, що пов'язують з наявністю у складі ферменту регуляторної ділянки, відокремленої від активного центра, для зв'язування з додатковими молекулами ненасиченої жирної кислоти [11, 12]. Гідрофобній формі 5-ЛО притаманна нижча спорідненість до субстрату порівняно з гідрофільною формою, про

що свідчить збільшення $[S]_{0,5}$. Відмінності у значеннях кінетичних констант двох форм 5-ЛО та їхня різна спорідненість до гідрофобного носія можуть бути пов'язані з утворенням стійкого комплексу ферменту з регулятором активності ліпофільної природи у разі гідрофобної форми 5-ЛО.

Щоб визначити механізм впливу ФЛ, отримано залежності V_{st} окиснення ЛК за каталітичної дії гідрофільної форми 5-ЛО від концентрації субстрату за присутності ФХ та ФІ (рис. 3). Слід відмітити, що присутність ФЛ у реакційній суміші не змінювала спектра продуктів реакції, а інкубація гідрофільної форми 5-ЛО з ФІ або ФХ за відсутності ЛК протягом 2 год не спричиняла змін оптичної густини реакційної суміші при $\lambda = 235$ нм. ФХ у концентрації 0,065 мг/мл зменшує стаціонарну швидкість

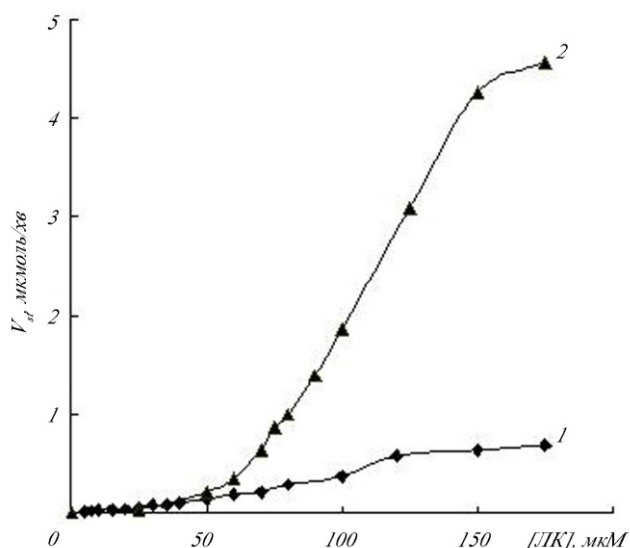


Рис. 2. Залежність стаціонарної швидкості реакції окиснення лінолевої кислоти від концентрації субстрату за каталітичної дії гідрофобної (1) та гідрофільної (2) форм 5-ліпоксигенази

Таблиця 2
Кінетичні константи реакції окиснення лінолевої кислоти за каталітичної дії 5-ліпоксигенази

Форма 5-ЛО	V_{max} , мкмоль/хв	$[S]_{0,5}$, мкМ	Коефіцієнт Хілла
Гідрофобна	1,18±0,30	143±40	1,9±0,2
Гідрофільна	5,62±0,27	118±4	4,0±0,2
Гідрофільна + + 0,065 мг/мл ФХ	1,99±0,50	164±67	1,2 ±0,1
Гідрофільна + + 0,0375 мг/мл ФІ	10,40±0,94	112±9	2,5±0,2
Гідрофільна + +0,075 мг/мл ФІ	10,70±1,07	104±14	1,7±0,1

реакції та викликає майже повне зникнення S-подібного перегину залежності V_{st} від концентрації ЛК (рис. 3, крива 1). ФІ на відміну від попереднього фосфоліпиду прискорює реакцію окиснення ЛК, однак його вплив на форму субстратної залежності подібний до такого ФХ (рис. 3, криві 2, 3).

Кінетичні константи даних реакцій, обраховані за рівнянням Хіла, представлено в табл. 2. Наявність обох ФЛ у реакційній суміші зменшує значення коефіцієнта Хіла, що свідчить про заміщення молекул субстрату в регуляторній ділянці 5-ЛО на

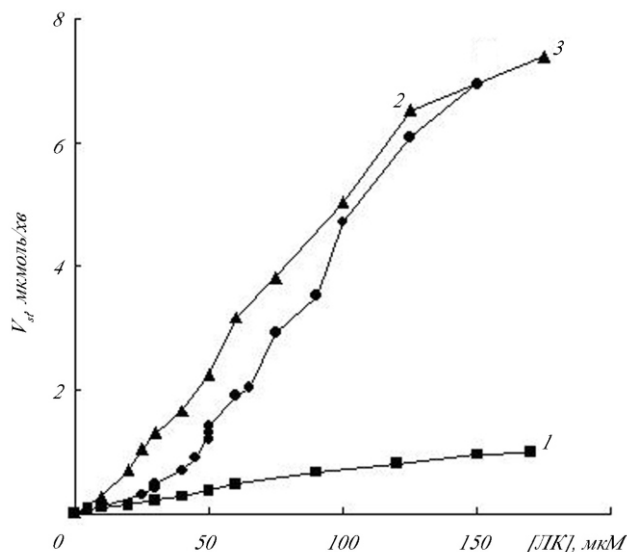


Рис. 3. Залежність стаціонарної швидкості реакції окиснення лінолевої кислоти від концентрації субстрату за каталітичної дії гідрофільної форми 5-ліпоксигенази за присутності 0,065 мг/мл фосфатидилхоліну (1) та 0,0375 мг/мл (2) і 0,075 мг/мл (3) фосфатидилінозиту

молекули ФЛ. Присутність ФЛ викликає незначні зміни значення $[S]_{0,5}$ у бік підвищення або зниження за дії ФХ чи ФІ відповідно.

Імовірним місцем локалізації регуляторної ділянки є N-кінцевий домен ферменту. Дана структура, згідно з літературними даними, забезпечує сорбцію та регуляцію активності ліпоксигеназ за рахунок взаємодії з ліпідною складовою мембранних структур [13] та має певні аналогії будови з С2-доменом фосфоліпаз та протеїнкінази С [3].

Одержані результати вказують на алостеричний механізм взаємодії ФХ та ФІ з 5-ЛО. Раніше подібний механізм запропоновано при дослідженні активації 5-ліпоксигеназного каталізу синтетичними аніонними амфіфільними сполуками, зокрема, додецилфосфонатом натрію, додецилсульфатом натрію, перфтороктановою і 2-гідрокси-2-трифторметилтранс-октадец-4-єною кислотами [14–16] та природним ФЛ – фосфатидною кислотою [5]. Базуючись на першорядному значенні аніонної природи алостеричних активаторів, автори висунули теорію адсорбційно-міцелярного механізму, яка передбачає існування у складі 5-ЛО позитивно зарядженої ділянки, що забезпечує сорбцію ферменту на негативно зарядженій міцелі [16]. Досліджен-

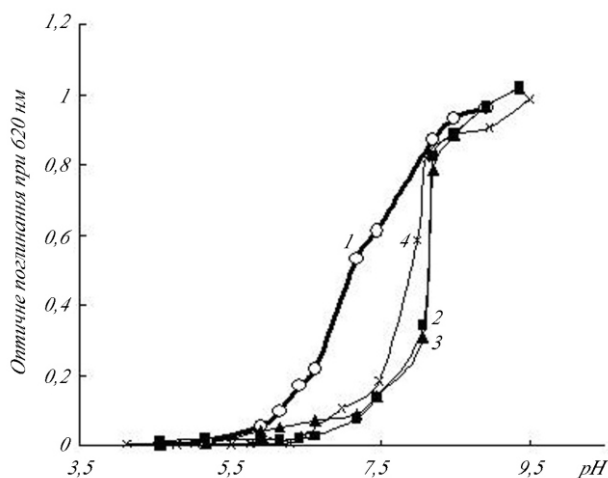


Рис. 4. Криві іонізації бромтимолового синього у міцелярних системах різного складу: 1 – водний розчин; 2 – 2 %-й Lubrol PX + 0,1 мМ лінолева кислота; 3 – те саме, що 2 + 0,075 мг/мл фосфатидилінозит; 4 – те саме, що 2 + 0,065 мг/мл фосфатидил-

ня ферментів ліпідного обміну зазвичай передбачає використання мембран або штучних систем, які забезпечують умови для гетерофазного каталізу. В даній роботі використано міцелярну систему, створену за допомогою неіонного детергента Lubrol PX, яка добре охарактеризована в попередніх роботах [16, 17]. Присутність у складі міцел різнозаряджених ФЛ може викликати зміну потенціалу на межі поділу вода:міцела і відповідно зсув рН, що буде впливати на сорбцію ферменту та перебіг каталітичних процесів. Для визначення вірогідних змін рН на поверхні міцел проаналізовано іонізацію ліпофільного індикатора – бромтимолового синього (БТС). Криві іонізації БТС, отримані у використаних в досліді міцелярних системах (рис. 4), характеризуються зсувом у лужну область рН на 1–0,9 одиниць порівняно з водним розчином, що свідчить про закиснення приповерхневого шару міцел. Присутність ФХ та ФІ у концентраціях 0,065 та 0,075 мг/мл відповідно не чинить додаткового впливу на іонізацію БТС. Одержані константи іонізації рН-індикатора дозволяють визначити значення поверхневого потенціалу міцел (ψ_s) за формулою:

$$\psi_s = \frac{(pK_a - pK_a^{obs})kT}{e}$$

де pK_a – константа іонізації БТС у розчині (за умов досліді дорівнює $7,145 \pm 0,06$); pK_a^{obs} – константа

Таблиця 3

Значення константи іонізації бромтимолового синього (pK_a^{obs}) та поверхневого потенціалу (ψ_s) міцел різного складу

Склад міцели	pK_a^{obs}	ψ_s , мВ
Lubrol PX:лінолева кислота	$8,06 \pm 0,11$	-53,0
Lubrol PX:лінолева кислота:фосфатидилінозит	$8,12 \pm 0,11$	-56,5
Lubrol PX:лінолева кислота:фосфатидилхолін	$8,02 \pm 0,13$	-50,7

іонізації БТС, соліобілізованого на поверхні міцели; k – константа Больцмана; T – температура, К; ϵ – діелектрична проникність середовища [9, 16]. Результати розрахунків pK_a^{obs} та ψ_s наведено у табл. 3. Очевидно, коливання ψ_s за присутності ФХ або ФІ є несуттєвим, отже, малоімовірно, що дія ФЛ на перебіг каталітичних процесів пов'язана із зміною заряду міцели. Це узгоджується із твердженням про провідну роль гідрофобних зв'язків порівняно з іонними у забезпеченні сорбції ліпоксигенази на поверхні мембранних структур [2, 3]. У той же час природа заряду молекули ФЛ може бути важливою в протонозалежних стадіях каталітичного циклу даного ферменту, що, ймовірно, і обумовлює різнонаправлений вплив ФХ та ФІ на максимальну швидкість реакції. Про це свідчить і першорядне значення карбоксильної групи у складі синтетичних амфифільних сполук, які активують ліпоксигеназний каталіз за алостеричним механізмом [16], та низька швидкість окиснення поліненасичених жирних сполук, у яких відсутня карбоксильна група (спиртів [18] та естерів [19]) за присутності 5-ЛО.

Висновки. У результаті досліджень кінетики окиснення лінолевої кислоти 5-ЛО з бульб картоплі за умов міцелярної системи показано, що гідрофільна і гідрофобна форми ферменту проявляють позитивну кооперативність стосовно субстрату і здатні приєднувати до чотирьох і двох молекул лінолевої кислоти відповідно. Вплив ФХ або ФІ на ліпоксигеназний каталіз реалізується за алостеричним механізмом, що підтверджується заміщенням молекул ЛК на молекули даних ФЛ у регуляторній ділянці ферменту.

Очевидно, що роль ліпідного складу мембрани в ліпоксигеназному каталізі полягає не лише в забезпеченні сорбції ферменту, а й у регуляції його

активності і відповідно коригуванні кількості біологічно активних метаболітів ліпоксигеназного ферментативного каскаду.

G. I. Kharitonenko, O. V. Kharchenko

Phosphatidylcholine and phosphatidylinositol are allosteric regulators of 5-lipoxygenase from potato tubers

Summary

Kinetic constants of the linoleic acid oxidation catalyzed by purified 5-lipoxygenase from Solanum tuberosum tubers have been determined. Hydrophilic and hydrophobic forms of the enzyme have been shown to bind linoleic acid with positive cooperativity in micellar system. Phosphatidylcholine and phosphatidylinositol binding to lipoxygenase results in the release of the substrate from the enzyme, causing the decrease or increase of the reaction rate, respectively. Presented findings imply the allosteric regulation of the 5-lipoxygenase activity by these phospholipids.

Keywords: 5-lipoxygenase, phospholipids, allosteric regulation.

A. И. Харитоненко, О. В. Харченко

Фосфатидилхолін і фосфатиділінозит – аллостерическі регулятори 5-ліпоксигенази из клубней картофеля

Резюме

Определены кинетические константы реакции окисления линолевой кислоты в присутствии очищенной 5-липоксигеназы из клубней Solanum tuberosum. Показано, что гидрофильная и гидрофобная формы фермента в мицеллярной системе проявляют положительную кооперативность относительно линолевой кислоты. Присоединение фосфатидилхолина или фосфатидилинозита к липоксигеназе приводит к высвобождению субстрата из фермента и, таким образом, к уменьшению или увеличению скорости реакции соответственно. Полученные результаты свидетельствуют об аллостерическом механизме регуляции активности 5-липоксигеназы указанными фосфолипидами.

Ключевые слова: 5-липоксигеназа, фосфолипиды, аллостерия.

PERELIK LITERATURI

1. Liavonchanka A., Feussner I. Lipoxygenases: occurrence, functions and catalysis // J. Plant Physiol.–2006.–**163**, N 3.–P. 348–357.
2. Walther M., Wiesner R., Kuhn H. Investigations into calcium-dependent membrane association of 15-lipoxygenase-1 // J. Biol. Chem.–2004.–**279**, N 30.–P. 3717–3725.
3. Kulkarni S., Das S., Funk C. D., Murray D., Cho W. Molecular basis of the specific subcellular localization of the C2-like domain of 5-Lipoxygenase // J. Biol. Chem.–2002.–**277**, N 15.–P. 13167–13174.
4. Бутович И. А., Паршикова Т. В., Бабенко В. М. Регуляторная роль фосфолипидов в реакции окисления линолевой кислоты 5-липоксигеназой // Биол. мембраны.–1992.–**9**, № 6.–С. 611–616.

5. Бутович И. А., Бабенко В. М., Ливарчук Л. В. Активация окисления линолевой кислоты 5-липоксигеназой из клубней картофеля под влиянием фосфатидовой кислоты // Биохимия.–1991.–**56**, № 6.–С. 1077–1081.
6. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem.–1976.–**72**, N 2.–P. 248–254.
7. Ornstein M., Davis J. Disk electrophoresis. Method and application to human serum proteins // Ann. N. Y. Acad. Sci.–1964.–**121**.–P. 321–330.
8. Gibian M., Vanderberger B. Product yield on oxygenation of linoleate by soybean lipoxygenase: the value of the molar extinction coefficient in the spectrophotometric assay // Anal. Biochem.–1987.–**163**, N 2.–P. 343–349.
9. Гордон Дж. Органическая химия растворов электролитов.–М.: Мир, 1979.–712 с.
10. Курганов Б. И. Аллостерические ферменты.–М.: Наука, 1978.–247 с.
11. Aharony D., Stein R. L. Kinetic mechanism of guinea pig neutrophil 5-lipoxygenase // J. Biol. Chem.–1986.–**261**, N 25.–P. 11512–11519.
12. Mogul R., Johansen E., Holman T. R. Oleyl sulfate reveals allosteric inhibition of soybean lipoxygenase-1 and human 15-lipoxygenase // Biochemistry.–2000.–**39**, N 16.–P. 4801–4807.
13. Hornig C., Albert D., Fisher L., Hornig M., Radmark O., Werz O. 1-oleoyl-2-acetyl-glycerol stimulates 5-lipoxygenase activity via a putative (phospho)lipid binding site within the N-terminal C2-like domain // J. Biol. Chem.–2005.–**280**, N 29.–P. 26913–26921.
14. Бутович И. А., Соломонок В. А., Солоденко В. А., Кухарь В. П. Активация 5-липоксигеназы липофильными н-алкилсодержащими кислотами – аллостерический процесс // Биоорг. химия.–1990.–**16**, № 2.–С. 270–272.
15. Харченко О. В., Кулініченко Г. І., Бутович І. А. Кінетичні механізми окиснення лінолевої кислоти 5-ліпоксигеназою з Solanum tuberosum // Укр. біохім. журн.–1999.–**71**, № 4.–С. 40–44.
16. Бутович И. А., Кухарь В. П. Амфифильные алифатические кислоты – активаторы 5-липоксигеназы. Адсорбционно-мицеллярный регуляторный механизм // Докл. АН СССР.–1991.–**316**, № 6.–С. 1486–1490.
17. Бутович И. А., Харченко О. В., Набока Ю. Н., Казачков М. Г. Характеристика агрегатного состояния субстрата в реакции 5-липоксигеназного окисления линолевой кислоты // Укр. биохим. журн.–2001.–**73**, № 2.–С. 39–43.
18. Butovich I. A., Luk'yanova S. M., Reddy C. C. Oxidation of linoleyl alcohol by potato tuber lipoxygenase: kinetics and positional, stereo, and geometrical (cis, trans) specificity of the reaction // Arch. Biochem. and Biophys.–2000.–**378**, N 1.–P. 65–67.
19. Butovich I. A., Reddy C. C. Enzyme-catalyzed and enzyme-triggered pathways in dioxygenation of 1-monolinoleoyl-rac-glycerol by potato tuber lipoxygenase // Biochim. et Biophys. Acta.–2001.–**1546**.–P. 379–398.

УДК 577.152.1

Надійшла до редакції 06.09.07