На правах рукописи

Петровский Арсений Сергеевич

Структурная модификация ферментных белков для изменения эффективности катализируемых реакций

03.01.06 – Биотехнология (в т.ч. бионанотехнологии)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2012

Работа выполнена на кафедре биотехнологии Российского химико-технологического университета им. Д.И. Менделеева.

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор

Эль-Регистан Галина Ивановна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор

Звягильская Рената Александровна

заведующая лабораторией биологического окисления Института биохимии им. А.Н. Баха РАН

доктор биологических наук, доцент

Лысак Людмила Вячеславовна

доцент кафедры биологии почв факультета почвоведения МГУ им. М.В. Ломоносова

Ведущая организация: Некоммерческое партнерство «Научно-технический центр «Лекарства и биотехнология»

Защита состоится «___» мая 2012 года в _____ на заседании объединенного диссертационного совета ДМ 212.204.13 в Российском химико-технологическом университете им. Д.И. Менделеева по адресу: 125047, Москва, Миусская пл., д. 9 в аудитории 443 (конференц-зал).

С диссертацией можно ознакомиться в Информационно-библиотечном центре РХТУ им. Д.И. Менделеева.

Автореферат диссертации разослан «___» _____ 2012 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

ДМ 212.204.13 Шакир И.В.

Актуальность проблемы. Ферменты – биологические катализаторы, широко используются в различных областях хозяйственной деятельности человека. Одной из отрицательных сторон использования ферментов является свойственная им нестабильность, обусловленная необратимым нарушением их нативной структуры физическими, химическими и биологическими воздействиями. Изучение закономерностей стабилизации структуры белков, обеспечивающей сохранение их функциональных характеристик, имеет фундаментальную и практическую значимость. Добавление стабилизирующих веществ в растворы ферментных белков является наиболее простым и эффективным способом сохранения их активности в денатурирующих условиях, однако, во многих случаях, приводит к снижению их каталитической функции [Варфоломеев, 2005]. Способностью корректировать структурно-динамическое состояние белков обладают, в том числе, низкомолекулярные соединения – химические шапероны (ХШ) [Welch and Brown, 1996]. К их числу относятся синтезируемые микроорганизмами и растениями алкилоксибензолы (АОБ), имеющие функции универсальных адаптогенов и протекторов, повышающих устойчивость микроорганизмов к неблагоприятным условиям, а в высоких концентрациях индуцирующих переход клеток микроорганизмов в покоящееся анабиотическое состояние [Эль-Регистан с соавт., 2006]. Механизм действия АОБ основан на их способности к формированию водородных связей, гидрофобных и электростатических взаимодействий с соответствующими группами и доменами биополимеров, в том числе, ферментных белков [Stasiuk, Kozubek, 2010]. Ранее на примерах простых моносубъединичных ферментов *in vitro* было показано, что воздействие АОБ приводит к изменению их каталитической активности и повышению стабильности [Мартиросова с соавт., 2004]. Однако механизмы направленной модификации не только простых, но и сложных ферментных белков с помощью АОБ остаются не изученными. Кроме того, большой интерес представляет выяснение возможности использования АОБ для регуляции активности ферментных систем в живых организмах.

Цель работы: изучить эффекты взаимодействия АОБ с простыми и сложными ферментными белками в составе ферментных препаратов и живых организмов, включая модуляцию каталитической активности, изменение субстратной специфичности и повышение стабильности ферментов, а также исследовать молекулярные механизмы, обусловливающие эти процессы.

Задачи исследования: (1) Изучить влияние различных изомеров и гомологов АОБ на функциональные характеристики сложных ферментных белков (пероксидазы): активность, функциональную и операционную стабильность, субстратную специфичность. (2) Провести сравнительный анализ изменений функциональных характеристик простых (лизоцима) и сложных (пероксидазы) ферментных белков, модифицированных различными гомологами и изомерами АОБ. (3) Изучить молекулярные механизмы действия АОБ как модификаторов структуры биополимеров, обусловливающих изменения

характеристик ферментных белков и эффективности ферментативных реакций. (4) Разработать приемы применения АОБ для регуляции каталитической активности и стабилизации ферментных белков в составе ферментных препаратов и живых организмов.

Научная новизна: (1) В опытах *in vitro* доказана способность различных гомологов АОБ модифицировать структуру сложных ферментных белков (пероксидазы), что приводит к изменению их каталитической активности и повышению устойчивости к денатурирующим воздействиям. (2) Впервые получена информация о влиянии пространственной организации ферментного белка на модифицирующие эффекты АОБ. Для простых моносубъединичных белков (лизоцима) решающую роль в их модификации играют структура АОБ и его концентрация, тогда как взаимодействие АОБ со сложными белками отличается: отсутствием зависимости модифицирующих эффектов от структуры АОБ; сужением диапазона действующих концентраций АОБ; влиянием на результативность модификации фермента времени его взаимодействия с АОБ (прединкубации). (3) Обнаружено, что модификация как простых, так и сложных ферментных белков с помощью АОБ приводит к снижению их субстратной специфичности, что обусловливает расширение спектра катализируемых субстратов. (4) На основании сравнения модифицирующих эффектов 10 гомологов и изомеров АОБ показано, что преимущественное влияние на вектор изменения (стимуляция-ингибирование) каталитической активности ферментов оказывают длина гидрофобного радикала и наличие заместителя во втором положении. (5) Методами молекулярной динамики белка и сканирующей микрокалориметрии установлено, что в результате воздействия одного из гомологов (С7-АОБ) на ферментный белок (лизоцим) повышается гидрофобная гидратация молекулы и понижается избыточная свободная энергии её денатурации, вследствие чего снижается конформационная стабильность белка и повышается его ферментативная активность.

Практическая ценность работы: (1) Приемы стабилизации и направленной модуляции каталитической активности простых и сложных ферментов с помощью АОБ должны учитывать зависимость выбора стабилизатора от свойств белка, концентрацию АОБ и время взаимодействия (прединкубации) АОБ с белком. (2) Модификация лизоцима АОБ приводит к увеличению его активности в отношении дрожжевых и грибных клеток, что может быть использовано в медицинской практике. (3) Предложены приемы регуляции каталитической активности ферментов в составе живых организмов. Контроль процесса солодоращения осуществляется внесением в замочную воду добавок АОБ, действие которых обусловливает деконтаминацию зерна от фитопатогенной микрофлоры и изменение активности гидролитических и окислительных процессов в зерне, что обеспечивает сокращение сроков солодоращения и повышение в солоде экстрактивных веществ.

Апробация работы. Результаты работы докладывались на Международной научно-

практической конференции «Биотехнология. Вода и пищевые продукты» (Москва, 2008); 5-ом Международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2009); XVI Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2009); X Юбилейной Международной научно-технической конференции «Оптические методы исследования потоков» (Москва, 2009), VIII Международной конференции «Биоантиоксидант» (Москва, 2010). По материалам диссертации опубликовано 10 работ, из них 4 статьи и 6 тезисов.

Структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 160 страницах и состоит из введения, обзора литературы (Глава 1), экспериментальной части, заключения, выводов и списка литературы, включающего 235 публикаций отечественных и зарубежных авторов. Диссертация иллюстрирована 9 таблицами и 35 рисунками.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования. В работе использовали простые ферментные белки: лизоцим яичного белка (Sigma), дезоксирибонуклеазу поджелудочной железы КРС (Самсон-Мед, С.-Петербург) и сложный ферментный белок – пероксидазу хрена (Sigma).

Биохимические методы анализа. В качестве структурных модификаторов ферментов использовали 10 химически чистых (99,9%) изомеров и гомологов АОБ (табл. 3), а также коммерческие препараты АОБ серии «Сидовит» (ООО «Новые технологии», Москва). Модификацию ферментов и полимерных субстратов проводили, смешивая их растворы с растворами АОБ и выдерживая смесь при t = 18-20°C в течение 0 (без прединкубации) или 10-60 мин (с прединкубацией). Активность лизоцима определяли: по степени снижения оптической плотности (ОП) суспензии клеток *Micrococcus luteus* фазы экспоненциального роста за 10 мин контакта [Gorin et al., 1971]; изменению максимальной скорости лизиса клеток (V_{max}) через 250-300 с контакта; по количеству редуцирующих веществ, образующихся при гидролизе пептидогликана (ПГ) клеточной стенки *M. luteus* [Бухарин с соавт., 2005] или коллоидного хитина [Miller, 1959]. Активность ДНКазы определяли по количеству кислоторастворимых веществ, образующихся при гидролизе ДНК [Дэвидсон, 1968]. Активность пероксидазы измеряли колориметрически по изменению окраски в индикаторной реакции разложения H_2O_2 и окисления субстратов о-дианизидина и 2,2'-азино-ди-(3-этил-бензотиазолин)-6-сульфокислоты (ABTS) [Фогарти, 1986]. Значения K_m и V_{max} реакции определяли из зависимостей Лайнуивера-Берка.

Физико-химические методы анализа. Термодинамические параметры денатурации лизоцима определяли методом дифференциальной сканирующей микрокалориметрии (ДСМК) [Privalov, Dragan, 2007; Spink, 2008] с использованием прибора ДАСМ-4 (КББП РАН, г. Пущино). Термограммы получали в диапазоне температур 7 – 110°C. Обработку термограмм в области денатурации белка проводили с помощью стандартной программы WScal [Privalov, Potekhin, 1986].

Методами молекулярной динамики, диффузного рассеивания рентгеновских лучей

(ДРРЛ) и Релеевского рассеивания Мёссбауэровского излучения (РРМИ) определяли картину структурно-динамической организации системы белок-вода-АОБ при различных концентрациях АОБ [Шайтан, 2004].

Вязкость растворов белков и их гидрофобность определяли методом ВЭЖХ [Хеншен с соавт., 1988].

Статистический анализ проводили, используя t-тест Стьюдента в программе Microsoft Excel при критерии вероятности $P \leq 0,05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Регуляция алкилоксибензолами каталитической активности и стабильности простых моносубъединичных ферментов

Влияние АОБ на функциональную активность лизоцима в отношении специфического субстрата – ПГ клеточной стенки бактерии *M. luteus*, определяли для нативного и модифицированного АОБ фермента по изменению максимальной скорости лизиса клеток (V_{max}) и проценту падения ОП бактериальной суспензии (табл. 1). Основным эффектом С7-АОБ во всем диапазоне используемых концентраций (10^{-7} – 10^{-3} М; мольное соотношение «фермент : АОБ» ($M_Ф$: $M_{АОБ}$) от 1 : 1 и выше) являлось дозозависимое повышение эффективности литической реакции при прогрессивном возрастании значения V_{max} от 10883 до 15864 КОЕ/мл·с и падении ОП бактериальной суспензии на 14 % (табл. 1). С12-АОБ оказывал на активность лизоцима дозозависимый, но ингибирующий эффект: при максимальной из использованных концентраций (10^{-3} М) скорость гидролиза снижалась в 4 раза, до 2658 КОЕ/мл·с.

Таблица 1.

Параметры литической реакции в системе «лизоцим – клетки *M. luteus*» при модификации фермента С7-АОБ и С12-АОБ, КОЕ/мл·с (% от контроля)

АОБ	Параметры литической реакции	Концентрация АОБ при модификации фермента, М					
		0 (контроль)	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}
С7-АОБ	Vmax, КОЕ/мл·с	9961 (100)	10883 (109)*[5]	11990 (120)	13005*[1] (131)	14388*[1] (144)	15864*[2] (159)
	ОП через 10 мин, % от исходной*[4]	80,4 (100)	78,6 (98)	76,5 (95)	74,5 (93)	71,7 (89)	68,8 (86)
С12-АОБ	Vmax, КОЕ/мл·с	10426 (100)	10108 (97)	8510 (82)	7426*[1] (71)	6342*[2] (61)	2658*[3] (25)
	ОП через 10 мин, % от исходной*[4]	79,5 (100)	80,2 (101)	83,3 (105)	85,4*[1] (107)	87,5*[2] (110)	94,8*[3] (119)

*[1] $P<0,05$; *[2] $P<0,01$; *[3] $P<0,001$; *[4] Начальные ОП = 0,5: 100 %; численность КОЕ клеток = $2,8 \times 10^7$ КОЕ/мл; *[5] % от контроля.

На эффективность литической реакции также влияла модификация субстрата, однако, в меньшей степени, чем фермента (табл. 2).

Таблица 2.

Изменение максимальной скорости лизиса клеток (V_{max}) при модификации С7-АОБ субстратов – клеток микрококка и изолированного ПГ, КОЕ/мл·с (% от контроля)

С7-АОБ, М	0 (контроль)	$7 \cdot 10^{-9}$	$7 \cdot 10^{-8}$	$7 \cdot 10^{-7}$	$7 \cdot 10^{-6}$	$7 \cdot 10^{-5}$
Клетки микрококка	6539 (100)	6824 (104)	7142 (109)	7309 (112)	7389 (113)	7916 (121)
ПГ	23585 (100)	23914 (101)	24874 (105)	26850 (114)	28319 (120)	29468 (125)

Влияние АОБ на функциональную активность лизоцима в отношении неспецифического субстрата. Новым и наиболее интересным эффектом модификации структуры лизоцима АОБ было изменение не только его активности, но и субстратной специфичности. При этом модификационные эффекты АОБ при гидролизе неспецифического субстрата – коллоидного хитина, были значительно более выражены, чем при воздействии на специфический субстрат – пептидогликан. Результативность гидролиза хитина зависела от структуры АОБ как лиганда и его концентраций (соотношений $M_Ф$: $M_{АОБ}$). Так, действие гидрофобного гомолога С12-АОБ в низких концентрациях (до 1,5 мг/мл) вызывало увеличение эффективности гидролиза хитина (до 575%), а в высоких концентрациях (больше 2,5 мг/мл) – ингибирование (рис. 1 а).

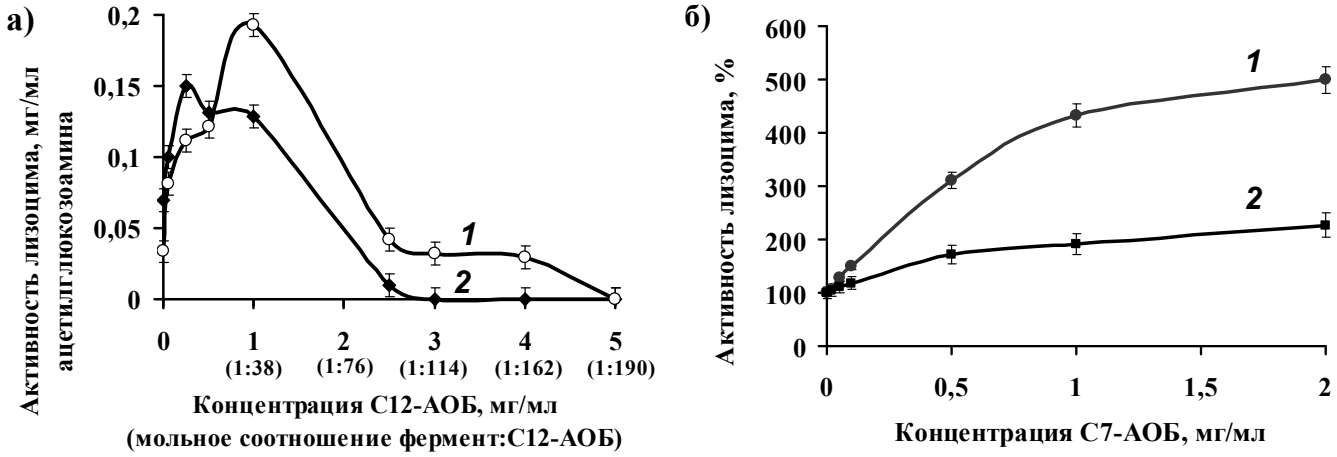

Рис. 1. Концентрационная зависимость действия С12-АОБ (а) и С7-АОБ (б) на ферментативную активность лизоцима при гидролизе коллоидного хитина (модификация фермента). Условия реакции: *1* – t = 37°С; *2* – t = 55°С; pH 5,5; время – 48 часов.

Другой гомолог С7-АОБ во всем диапазоне испытанных концентраций не обладал ингибирующим действием (рис. 1 б). Количество ацетилглюкозамина, образуемого модифицированным лизоцимом возрастало при: 1) увеличении концентрации АОБ до 0,5 – 1,0 мг/мл; 2) повышении температуры до 55°С; 3) увеличении времени прединкубации фермента с АОБ до 1 час.

Отмечено, что: 1) окисленные формы АОБ также обладали белок модифицирующим действием, при этом более эффективным, чем нативные; 2) модификационный эффект АОБ был более выражен в неоптимальных для ферментативной реакции условиях, что

важно для расширения диапазона (t°C, pH) эффективного ведения биотехнологических процессов.

Определение кинетических параметров гидролиза субстратов модифицированным АОБ лизоцимом. Эффекты С7-АОБ в широком диапазоне активирующих концентраций (0,001 – 0,032 М) в реакциях гидролиза (как специфического, так и) неспецифического субстрата – хитина, были характерны для активаторов неконкурентного типа:

Концентрация С7-АОБ, М	0	0,001	0,004	0,008	0,016	0,032
K_m	38,0	135,7	135,7	135,7	38,0	38,0
V_{max}, мг/мл·ч	0,056	0,18	0,19	0,2	0,09	0,12

Кинетика реакций, катализируемых лизоцимом, модифицированным С12-АОБ, подчинялась более сложным закономерностям. В экспериментах со специфическим субстратом использовали различные концентрации клеток (ОП = 0,1 ÷ 0,7 или КОЕ/мл = $0{,}55 \cdot 10^7$ ÷ $3{,}9 \cdot 10^7$) при стандартной концентрации фермента, 10^{-5} М. Результаты, проанализированные в координатах Лайнуивера-Берка, показали, что модификационные эффекты С12-АОБ по существующим представлениям характерны для действия ингибиторов смешанного типа:

Концентрация С12-АОБ, М	0	10^{-7}	10^{-5}	10^{-3}
K_m	5,54	7,18	5,78	6,26
V_{max}, КОЕ · 10^4/мл·ч	7,57	7,46	5,23	4,03

Проведение графического анализа результатов, полученных при гидролизе клеток микрококка, в системах координат, характеризующих S; S/V и V/S; V, подтвердило это заключение (рис. 2): зависимости S/V от S и V от V/S при концентрации С12-АОБ 10^{-7} М характерны для конкурентного типа ингибирования, тогда как при насыщающих концентрациях С12-АОБ – для смешанного типа ингибирования.

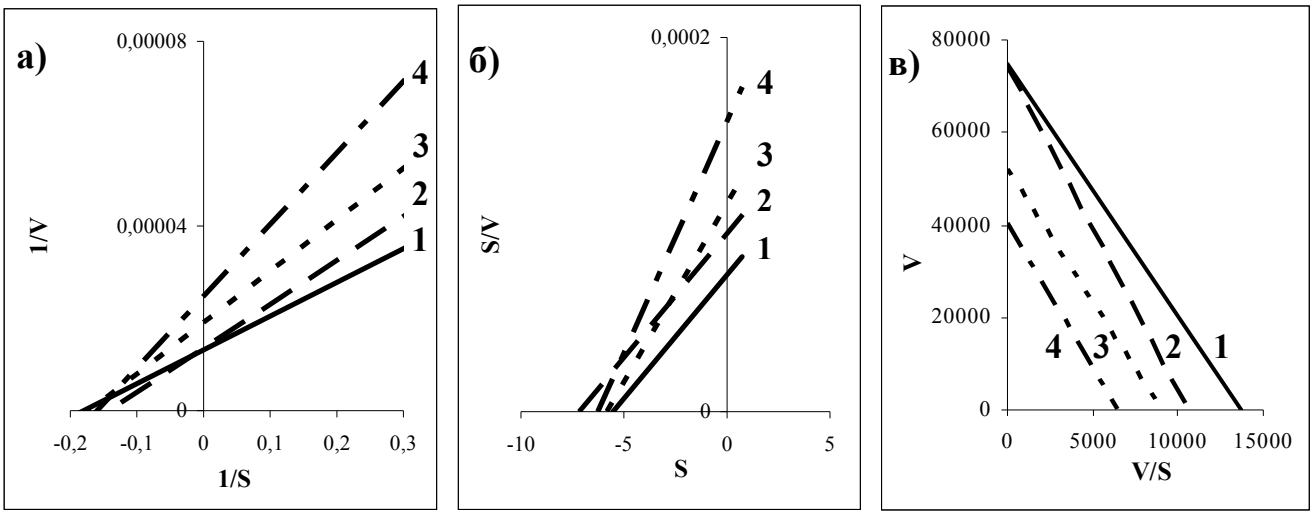

Рис. 2. Графики, описывающие зависимости между концентрацией субстрата – клетки *M. luteus* (S), и скоростью (V) их гидролиза лизоцимом (10^{-5} М), модифицированным С12-АОБ в концентрациях: *1* – контроль; *2* – 10^{-7} М; *3* – 10^{-5} М; *4* – 10^{-3} М.

Влияние АОБ на устойчивость лизоцима к денатурирующим воздействиям. Модификация структуры фермента, отражающаяся на его каталитической активности,

влияла на: (1) функциональную стабильность (сохранение каталитической функции после денатурирующих воздействий): модифицированный С7-АОБ (2 мг/мл) фермент после термообработки в течение 30 – 90 мин при 70°С обладал большей остаточной активностью, чем нативный (рис. 3 а); (2) операционную стабильность (сохранение высокой активности в неоптимальных условиях катализа): лизоцим, модифицированный С7-АОБ (1 мг/мл), в широком диапазоне температур (30-55°С) имел такую же (или выше) активность при гидролизе хитина, как и нативный фермент при оптимальной температуре (53°С) (рис. 3 б).

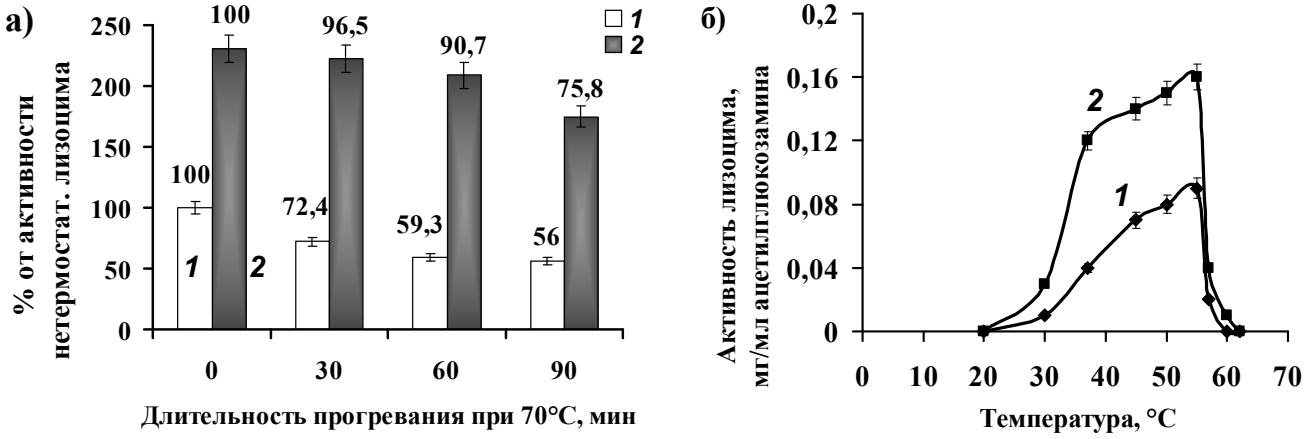

Рис. 3 Функциональная (а) и операционная (б) термостабильность нативного (*1*) и модифицированного (*2*) лизоцима. Условия реакции: концентрация С7-АОБ (а) – 2 мг/мл, (б) – 1 мг/мл; субстрат – коллоидный хитин.

Влияние АОБ на каталитическую активность ДНКазы. Характер влияния С7- и С12-АОБ на активность другого моносубъединичного фермента, ДНКазы, был аналогичен показанному для лизоцима, хотя эффективные концентрации были ниже и действие менее выражено. Амфифильный гомолог С7-АОБ в широком диапазоне концентраций вызывал увеличение активности фермента (рис. 4 а), диапазон активирующих концентраций С12-АОБ был незначителен (0,01 – 0,10 мг/мл) (рис. 4 б), в дозах более 0,11 мг/мл он ингибировал активность фермента.

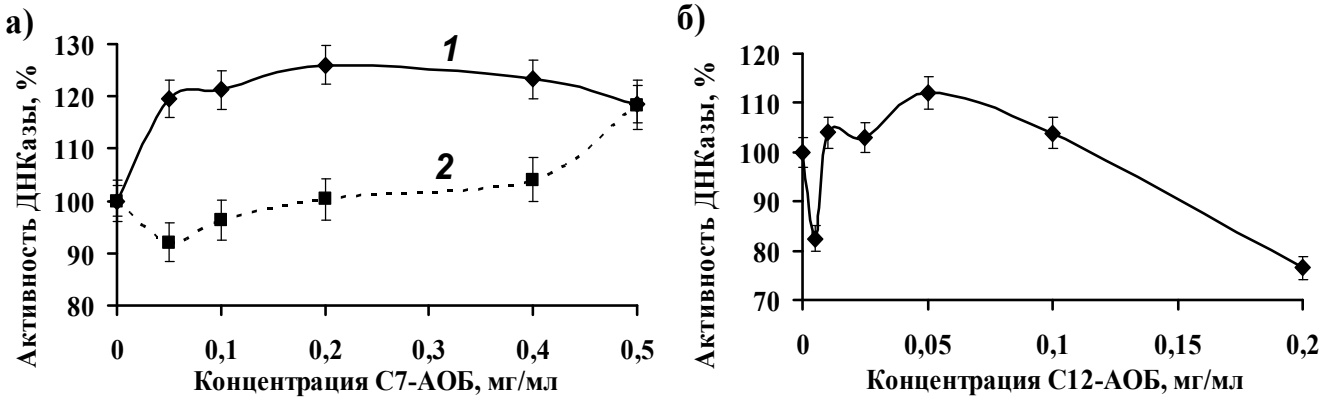

Рис 4. Действие на активность ДНКазы (время прединкубации 30 мин) (а) С7-АОБ: *1* – неокисленная форма, *2* – окисленная форма; (б) С12-АОБ.

На примере ДНКазы было более детально исследовано влияние структуры АОБ на модуляцию ферментативной активности (табл. 3). Активирующим действием обладали АОБ, имеющие метильный радикал в 5-ом (С7-АОБ) и/или 2-ом положении; имеющие углеводородный радикал в 4-ом (С12-АОБ) или 5-ом положении – обладали двойственностью эффектов; увеличение длины радикала в 5-ом положении коррелировало с усилением ингибиторных свойств.

Таблица 3.

Действие изомеров АОБ на активность ДНКазы (диапазон концентраций АОБ 0–0,8 мг/мл)

Изомеры АОБ	Стимуляция активности		Ингибирование активности	
	Диапазон концентраций, мг/мл	% от контроля (концентрация АОБ, мг/мл)	Диапазон концентраций, мг/мл	% от контроля (концентрация АОБ, мг/мл)
5-метилрезорцин (С7-АОБ)	0-0,8	126 (0,2)	-	-
2-метилрезорцин	0-0,8	120 (0,05)	-	-
2,5-диметилрезорцин	0-0,8	111 (0,2)	-	-
2-этил-5-метилрезорцин	0-0,8	123 (0,4)	-	-
2,4-диметилрезорцин	0-0,5	108 (0,02)	0,5-0,8	83 (0,8)
5-этилрезорцин	0-0,06	108 (0,02)	0,06-0,8	88 (0,8)
5-пропилрезорцин	0-0,06	106 (0,02)	0,06-0,8	68 (0,8)
5-додецилрезорцин	-	-	0,02-0,8	0 (≥0,06)
4-гексилрезорцин (С12-АОБ)	0,07-0,12	112 (0,05)	0,12-0,8	0 (≥0,25)
2-(4-гидроксифенил)-этан-1-ол (тирозол)	0-0,8	119 (0,8)	-	-

Таким образом, модификация структуры простых ферментных белков АОБ помимо влияния на эффективность катализируемых ими реакций и на повышение стабильности ферментов обусловливает изменение их субстратной специфичности. Наибольшее значение для модификационных эффектов АОБ имеют их структура и концентрация, варьированием которых можно направленно влиять на функциональную активность ферментов.

3.2. Регуляция алкилоксибензолами каталитической активности и стабильности сложных ферментных белков

Влияние АОБ на каталитическую активность пероксидазы. Объектом исследования была пероксидаза хрена, сложный ферментный белок, состоящий из гликопротеина и геминового компонента, включающего протопорфирин IX и Fe^{+3}.

О модифицирующем действии С7- и С12-АОБ судили по изменению каталитической активности пероксидазы в отношении двух субстратов, о-дианизидина и ABTS, в вариантах без или с прединкубацией (10 – 30 мин) (рис. 5). За 100% активности принимали для о-дианизидина – 180 ед/мин·мг белка, для ABTS – 920 ед/мин·мг белка. Характер воздействия обоих гомологов на активность пероксидазы отличался от их

эффектов на простые ферментные белки, что, вероятно, связано с влиянием АОБ как на третичную, так и четвертичную структуру фермента: 1) эффекты гомологов были довольно схожими и слабо зависели от их структуры; 2) каталитическая активность и уровень модифицирующего действия существенно зависели от используемого субстрата; 3) на модифицирующие эффекты влияло время прединкубации АОБ с белком.

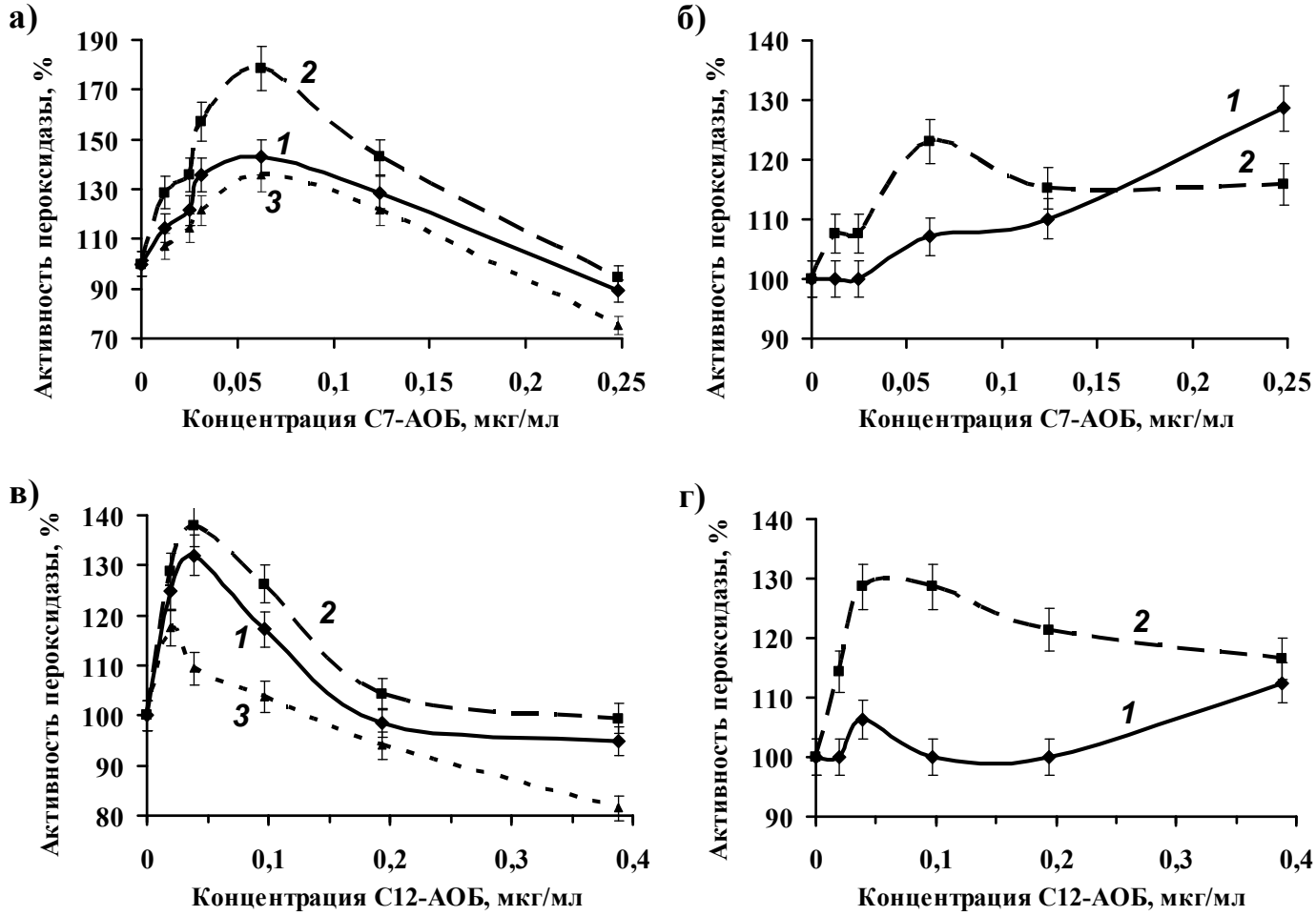

Рис. 5. Действие С7-АОБ (а, б) и С12-АОБ (в, г) на ферментативную активность пероксидазы при окислении субстратов: о-дианизидина (а, в) и ABTS (б, г); время прединкубации: *1* – без прединкубации, *2* – 10 мин, *3* – 20 мин.

Концентрационные зависимости эффектов АОБ при окислении о-дианизидина и ABTS отличались: оба лиганда имели узкий диапазон активирующих концентраций (0,02 – 0,2 мкг/мл) при окислении о-дианизидина (рис. 5 а, в); при окислении ABTS (рис. 5 б, г) не наблюдалось ингибиторной области, а величины стимуляции активности были менее выражены (до 130%). Таким образом, модифицирующий эффект АОБ при их взаимодействии со сложным ферментным белком, также как и с простыми ферментами, был более выражен для «низкокатализируемых» субстратов.

Использование с биотехнологическими целями коммерческих препаратов Сидовита 1 и 2 (на основе окисленных форм С7-АОБ) подтвердило концентрационный характер их действия и зависимость эффектов от используемых субстратов, отличаясь при этом более высокими активирующими концентрациями.

На результативность катализируемой реакции влияла также модификация субстрата, что подтверждает данные, полученные ранее для ферментов гидролаз [Степаненко с соавт., 2001; Мартиросова с соавт., 2004]. При предварительном взаимодействии АОБ с о-дианизидином эффективность катализа возросла на 25% для С7-АОБ и на 30% для С12-АОБ (рис. 6).

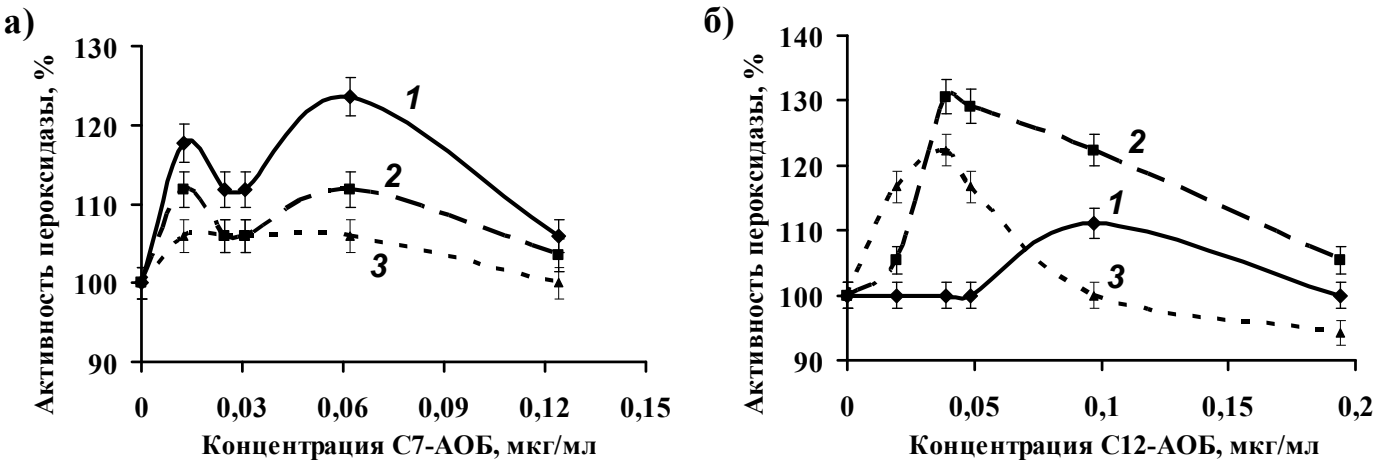

Рис. 6. Действие С7-АОБ (а) и С12-АОБ (б) на ферментативную активность пероксидазы при модификации субстрата о-дианизидина: время прединкубации: *1* – 10 мин, *2* – 20 мин, *3* – 30 мин.

Влияние АОБ на устойчивость пероксидазы к денатурирующим воздействиям. Модификация структуры фермента АОБ (также препаратами Сидовит) приводила к повышению его функциональной стабильности: активность модифицированной как С7-, так и С12-АОБ пероксидазы в отношении о-дианизидина и ABTS после термообработки (15 мин, 70°С) была выше, чем в контроле на 10-42% (табл. 4).

Влияние АОБ на термостабильность пероксидазы **Таблица 4.**

АОБ	Концентрация АОБ	Активность пероксидазы, % от контроля до термообработки (остаточная активность, % после термообработки)	
		Субстрат	
		о-дианизидин	ABTS
С7-АОБ	0 (контроль)	100 (45,1)	100 (33,0)
	0,0124 мкг/мл (0,1 мкМ)	128,6 (61,0)	107,6 (75,2)
	0,248 мкг/мл (2 мкМ)	94,5 (62,5)	115,9 (50,6)
С12-АОБ	0 (контроль)	100 (48,9)	100 (34,0)
	0,0194 мкг/мл (0,1 мкМ)	128,7 (71,4)	114,3 (59,1)
	0,388 мкг/мл (2 мкМ)	99,4 (60,0)	116,5 (44,2)

Сравнительный анализ действия АОБ на простые и сложные ферментные белки показал, что если для моносубъединичных белков решающее значение в модификационных процессах имеют структура и концентрация АОБ, то для сложных ферментов – время их взаимодействия с АОБ при сравнительно узком диапазоне эффективных концентраций обоих модификаторов. По-видимому, в последнем случае АОБ действуют не только на третичную структуру апофермента, но и на взаимодействия

компонентов сложных белков.

Таким образом, можно констатировать, что АОБ в результате их взаимодействия с макромолекулами белков способны направленно изменять каталитическую активность как простых, так и сложных ферментных белков, повышать их стабильность к денатурирующим воздействиям и влиять на сродство к субстрату.

3.3. Молекулярные механизмы действия АОБ

Как правило, стабилизация ферментных белков добавками сопровождается ингибированием их каталитической активности [Göller, Galinski, 1999]. Механизмы взаимодействий, при которых наряду с повышением стабильности фермента наблюдается одновременное увеличение его активности, что характерно для эффектов АОБ, до сих пор не выяснены. Методами молекулярной динамики (ДРРЛ и РРМИ) было показано, что взаимодействие лизоцима с С7-АОБ в широком диапазоне концентраций (а для С12-АОБ в области активирующих концентраций) приводит к увеличению междоменной подвижности и, как следствие, каталитической активности лизоцима. При изучении молекулярных механизмов действия С7-АОБ методом дифференциальной сканирующей микрокаллориметрии (ДСМК) были исследованы термодинамические параметры денатурации (10-110°С) нативного и модифицированного С7-АОБ лизоцима (1 ч и 120 ч прединкубации) при различных r – мольных соотношениях С7-АОБ/лизоцим. Обнаруженная в вариантах 1 ч прединкубации симметричность пика избыточной теплоемкости связана с кооперативным переходом лизоцима из упорядоченного в менее упорядоченное состояние по модели двух состояний, тогда как при 120 ч прединкубации несимметричность пика предполагала наличие более одной кооперативной единицы перехода. Из термограмм денатурации лизоцима были определены: температура денатурации (T_d) (рис. 7 а), молярная энтальпия денатурации ($\Delta_d H_{Cal}$ (T_d)) (рис. 7 б) и разность теплоемкости белка в денатурированном и нативном состояниях ($\Delta_d C_p$) (рис. 7 в).

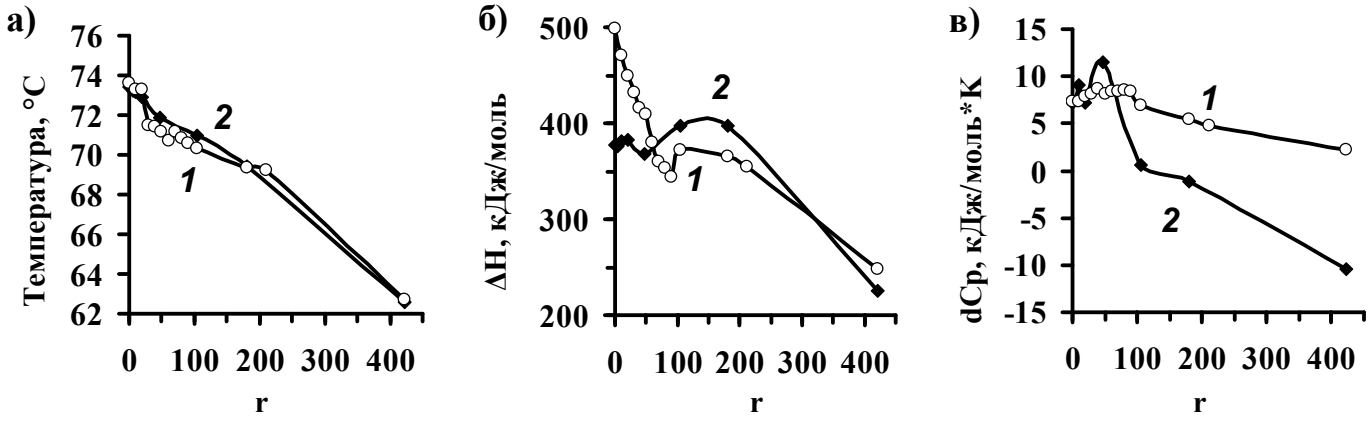

Рис. 7. Зависимость (а) температуры денатурации лизоцима (T_d); (б) молярной энтальпии денатурации лизоцима ($\Delta_d H_{Cal}$ (T_d)); (в) разности теплоемкости лизоцима в денатурированном и нативном состояниях ($\Delta_d C_p$) – от молярного соотношения С7-АОБ/лизоцим (r) и времени прединкубации 1 ч (*1*) и 120 ч (*2*).

Анализ полученных зависимостей (рис. 7) и рассчитанные величины свободной энергии денатурации лизоцима (рис. 8), модифицированного С7-АОБ, свидетельствовали об уменьшении термостабильности модифицированного лизоцима вследствие его предпочтительного связывания с денатурированной формой белка. Эти результаты согласуются с данными определения молекулярной динамики и модифицированного лизоцима и объясняют повышение его активности. Увеличение скачка теплоемкости между нативным и денатурированным состоянием лизоцима в области r = 0 – 50 свидетельствовало о повышении гидрофобной гидратации белка. Возможно, что наблюдаемое повышение функциональной и операционной стабильности модифицированного лизоцима связано со способностью АОБ образовывать множественные водородные связи, приводящие к формированию вокруг молекулы белка сольватной оболочки, отличающейся от объемной водной фазы.

Расчет зависимостей избыточной свободной энергии денатурации лизоцима ($\Delta_d G^E$) от концентрации С7-АОБ при различных температурах указывает на дестабилизирующее действие лиганда, усиливающееся с ростом его концентрации и понижением температуры системы. Важно, что в диапазоне концентраций С7-АОБ 0,05 – 1,74 мг/мл (r = 3 – 100), приводящих к резкому снижению $\Delta_d G^E$, наблюдалось наибольшее увеличение активности фермента, показанное выше (рис. 1 б) и сочетающееся с его функциональной стабильностью (рис. 3). Увеличение внутримолекулярной подвижности белка обеспечивает не только повышение его активности, но и может быть причиной снижения субстратной специфичности, что, в свою очередь, обусловливает расширение спектра катализируемых субстратов.

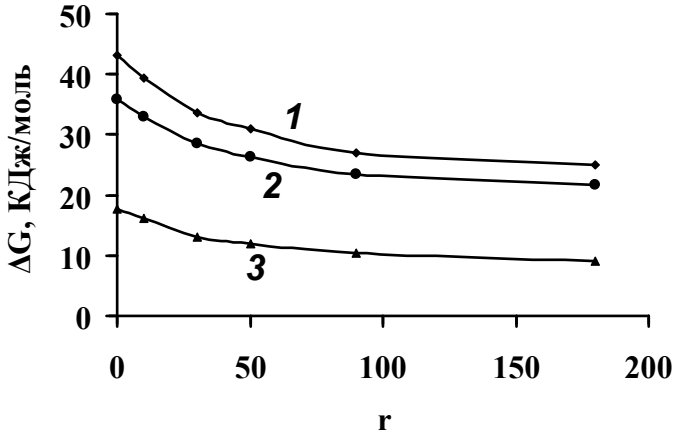

Рис. 8. Концентрационное влияние С7-АОБ на величину свободной энергии денатурации лизоцима при различных значениях температуры (время инкубирования 1 ч): *1* – t = 25°C; *2* – t = 40°C; *3* – t = 60°C.

Нелинейный характер температурной зависимости $\Delta_d H_{Cal}(T_d)$ от T_d при 120 ч прединкубации указывал на наличие более чем одного конформационного перехода, что подтверждено расчетом критерия ΔHcal/ΔHvh (табл. 5). В случае 1 час прединкубации величина критерия близка к 1, что свидетельствует о применимости модели двух состояний. Однако, в случае длительного (120 ч) взаимодействия «фермент-АОБ» эта модель не применима. В последнем случае деконволюция показывает наличие в системе двух переходов, отражающих процессы плавления лизоцима: 1) в составе образовавшихся

белковых агрегатов ($\Delta H_{cal}/\Delta H_{vh} \geq 2$) и 2) плавление двух структурных доменов лизоцима в рамках конформационного перехода белковой глобулы ($\Delta H_{cal}/\Delta H_{vh} \leq 2$).

Таблица 5.

Зависимость ΔHcal/ΔHvh от молярного соотношения С7-АОБ/лизоцим при времени инкубирования 1 и 120 ч

r	ΔHcal/ΔHvh		
	1 ч инкубация	120 ч инкубация	
		Результаты деконволюции	
		Низкотемпературный пик	Высокотемпературный пик
0	1,06	5,99	1,66
5	0,98	5,21	1,81
10	0,951	4,85	1,79
20	0,806	5,62	1,64
50	0,921	5,05	1,81
105	0,994	2,06	1,64
180	0,778	2,18	1,77

Таким образом, взаимодействия белка с АОБ приводят к изменениям его физико-химических констант и вследствие этого к повышению каталитической активности и функциональной стабильности, снижению субстратной специфичности.

3.4. Биотехнологические аспекты применения АОБ

Результаты исследований участия АОБ в модификации ферментных белков могут быть использованы в различных биотехнологических практиках. Приведем некоторые примеры применения АОБ.

3.4.1. Изменение субстратной специфичности лизоцима важно для расширения их антимикробной специфичности [Ibrahim, 1998]. Если спектр модификантов, активных против $Г^+$ и $Г^-$ бактерий, достаточно велик [Radwan et al., 1994, Lesnierowski et al., 2004], то лизоцимов, действующих на грибные и дрожжевые клетки, практически неизвестно. Лизоцим, модифицированный С7-АОБ, оказался активен как в отношении хитина и, следовательно, грибов, так и интактных дрожжевых клеток *S. cerevisiae*, максимальный выход редуцирующих сахаров в обоих вариантах опытов наблюдался при концентрации С7-АОБ 2 мг/мл.

3.4.2. Поддержание активности фермента ДНКазы в водных растворах при хранении. Одной из проблем применения ДНКазы в медицине является быстрая потеря активности её водных растворов. ДНКаза, модифицированная С7-АОБ (0,1 мг/мл), оказалась более стабильной: активность фермента через 24 часа была в 5,3 раза выше контрольной, а через 48 часов – в 4,5 раза.

3.4.3. Регуляция процессов солодоращения. Возможность направленной регуляции активности ферментов алкилоксибензолами позволяет решить в технологии солода комплексную задачу обеспечения необходимых изменений в прорастающем зерне с его

одновременной деконтаминацией.

Дезинфекция зерна. Обработка препаратом Сидовит, который вносили в первую замочную воду (0,1 г/л воды) в 16 раз снижала количество внутренней микрофлоры, имеющей самые негативные технологические последствия и не уничтожаемой традиционной обработкой ($KMnO_4$), и в 3 раза – поверхностной микрофлоры:

Поверхностная микрофлора, КОЕ/г		Внутренняя микрофлора, КОЕ/г	
Контроль ($KMnO_4$)	Сидовит	Контроль ($KMnO_4$)	Сидовит
$4{,}4 \cdot 10^6$	$1{,}5 \cdot 10^6$	$1{,}6 \cdot 10^4$	$1{,}0 \cdot 10^3$

Влияние на прорастание и развитие вегетативных органов ячменя. Для активации процесса солодоращения в замочную воду добавляли растворы С7-АОБ (3 мкг/мл), С12-АОБ (0,3 мкг/мл) и препарата Сидовит различной концентрации (табл. 6). Все препараты увеличивали число проросших зерен, стимулировали рост корешка, тормозили развитие листового проростка, что является положительным результатом в технологии солодоращения.

Таблица 6.

Действие С7- и С12-АОБ (время проращивания 6 сут) и сидовита 2 (время проращивания 3 сут) на рост и развитие вегетативных органов зерна ячменя

Стадия прорастания	Количество зерен, %					
	Контроль	С7-АОБ, 3 мкг/мл	С12-АОБ, 0,3 мкг/мл	Сидовит, мкг/мл		
				0	0,15	7,5
Проросшие	90	100	96	92	100	92
С длиной корешка 1,5 длины зерна	80	98	95	80	97	90
С листочками	20	1	5	32	2	6

Влияние АОБ на ферментативные процессы в ячмене. Определение активности фермента пероксидазы в зерне, обработанном АОБ, подтвердило стимуляцию метаболических процессов (рис. 9). После внесения в замочную воду С7- и С12-АОБ (3 и 0,3 мкг/мл, соответственно) активность пероксидазы в опытных образцах составила 185 и 175 ед/мин против 112 ед/мин в контрольных. Активность пероксидазы в зерне, обработанном препаратом Сидовит (0,15 и 7,5 мкг/мл), также оказалась выше контрольной на 120 и 80 %, соответственно.

При повторной (через 4 сут) обработке ячменя С7- или С12-АОБ (50 и 3 мкг/мл, соответственно) (рис. 9) или препаратом Сидовит (250 мкг/мл) как активность ферментов, так и рост вегетативных органов в зерне ингибировались. Сочетание приемов стимуляции прорастания ячменя с последующим ингибированием ростовых процессов эффективно в технологии солодоращения для сокращения сроков получения солода и повышения в нем экстрактивных веществ.

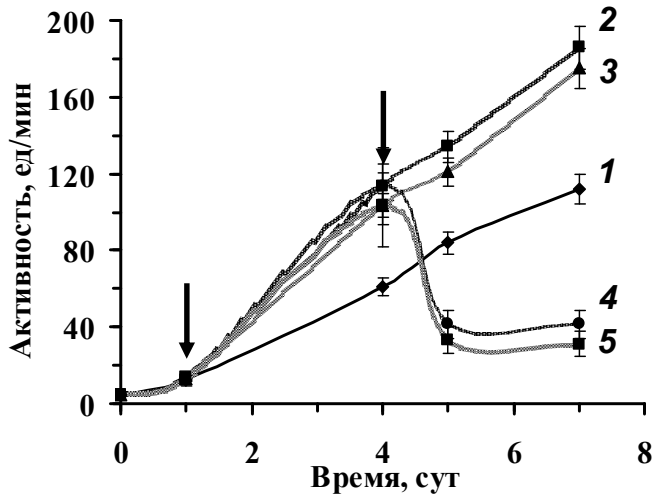

Рис. 9. Влияние АОБ на активность пероксидазы ячменя: *1* – контроль; *2* – 3 мкг/мл С7-АОБ; *3* – 0,3 мкг/мл С12-АОБ; *4* – внесение через 4 сут 50 мкг/мл С7-АОБ; *5* – внесение через 4 сут 3 мкг/мл С12-АОБ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обобщенный анализ результатов настоящего исследования демонстрирует роль АОБ в стабилизации и модуляции активности как простых, так и сложных ферментных белков. Варьируя параметры процесса модификации биополимеров: структуру гомологов АОБ, их концентрации, время взаимодействия с белком – можно направленно регулировать эффективность ферментативных реакций. Продемонстрированная схожесть в действии АОБ на простые и сложные белки предполагает универсальность их регуляторной функции в биологических системах. Изменение каталитической активности белков в их комплексах с АОБ коррелирует с изменением физико-химических свойств биополимеров. Результаты ДСМК свидетельствуют как о дестабилизации нативной конформации лизоцима С7-АОБ, так и о его предпочтительном взаимодействии с денатурированной формой белка и повышении гидрофобной гидратации глобулы, образовании множественных водородных связей, что может быть объяснением, как повышения каталитической активности, так и функциональной стабильности ферментного белка. Понижение избыточной энергии денатурации модифицированного лизоцима отражает увеличение свободного объема и конформационной подвижности фрагментов макромолекулы, что не только способствует повышению активности фермента, но и приводит к увеличению доступности для неспецифического субстрата дополнительных участков в районе активного центра фермента. Эта новая модификационная функция АОБ важна для объяснения их адаптогенного действия, а также эффективного решения ряда биотехнологических задач. Увеличение скачка теплоемкости между нативным и денатурированным состояниями лизоцима в присутствии С7-АОБ свидетельствует о повышении гидрофобной гидратации белка в присутствии С7-АОБ и объясняет его большее сродство к воде, согласно полученным ранее данным [Крупянский с соавт., 2011].

Описанные модификационные эффекты АОБ объясняют их широкие адаптационные возможности для защиты микро- и макроорганизмов от стрессорных воздействий. В

области биотехнологии использование АОБ перспективно для повышения эффективности производств, основанных на использовании ферментных препаратов или направленной регуляции энзиматических процессов в живых организмах.

ВЫВОДЫ

1. Показана способность химических аналогов микробных ауторегуляторов – алкилоксибензолов, изменять конформацию как простых, так и сложных ферментных белков, что обусловливает изменение их каталитической активности и повышение операционной и функциональной стабильности.

2. Модифицирущее действие АОБ зависит от природы ферментного белка: если модуляция каталитической активности простых белков, в основном, определяется структурой и концентрацией АОБ, то сложных белков – временем воздействия АОБ при сравнительно узком диапазоне их эффективных концентраций.

3. Следствием изменения конформации модифицированных АОБ ферментов является расширение спектра используемых субстратов. При этом как для простых, так и для сложных ферментных белков модифицирующие эффекты (изменение активности) более выражены в отношении «низкокатализируемых» субстратов.

4. Кинетические параметры реакций, катализируемых модифицированными АОБ ферментами, позволили отнести С7-АОБ к активаторам неконкурентного типа, а С12-АОБ – к ингибиторам смешанного типа.

5. Физико-химическими методами (ДСМК) показано понижение конформационной стабильности и снижение избыточной энергии денатурации модифицированного С7-АОБ белка (лизоцима), что объясняет повышение его активности и снижение субстратной специфичности.

6. Установлено, что взаимодействия С7-АОБ с ферментным белком (лизоцимом) приводят к образованию новых водородных связей и повышению его гидрофобной гидратации, что возможно является причиной повышения функциональной стабильности белка.

7. Применение АОБ позволяет регулировать эффективность действия ферментов в составе живых организмов.

Список работ, опубликованных по материалам диссертации

1. Петровский А.С., Дерябин Д.Г., Лойко Н.Г., Михайленко Н.А., Кобзева Т.Г., Канаев П.А., Николаев Ю.А., Крупянский Ю.Ф., Козлова А.Н., Эль-Регистан Г.И. Регуляция алкилоксибензолами функциональной активности лизоцима // Микробиология. 2009. Т. 78. № 2. С. 176-185.

2. Plashchina I.G., Zhuravleva I.L., Martirosova E.I., Petrovskii A.S., Loiko N.G., Nikolaev Yu.A., El’-Registan G.I. Effect of Methylresorcinol on the Catalytic Activity and Thermostability of Hen Egg White Lyzozyme. In Biotechnology, Biodegradation, Water and Foodstuffs. Nova Science Publishers. N.-Y. 2009. P. 45-57.

3. Martirosova E.I., Plashchina I.G., Zhuravleva I.L., Petrovskii A.S., Loiko N.G., El'-Registan G.I. Effect of Methylresorcinol on the Catalytic Activity and Thermostability of Hen Egg White Lysozyme depending on the storage time. In Biotechnology in Medicine, Foodstuffs, Biocatalysis, Environment and Biogeotechnology. Nova Science Publishers. N.-Y. 2010. P. 87-97.

4. Мартиросова Е.И., Журавлева И.Л., Плащина И.Г., Петровский А.С., Лойко Н.Г., Эль-Регистан Г.И. Регулирование каталитической активности и функциональности лизоцима куриного яйца с использованием алкилоксибензолов // Вестник Московского университета. Серия 2. Химия. 2010. Т. 51. № 3. С. 203-208.

5. Плащина И. Г., Журавлева И.Л., Петровский А.С., Лойко Н.Г., Николаев Ю.А., Крупянский Ю.Ф., Эль-Регистан Г.И. Эффект метилрезорцина на ферментативную активность и конформационную стабильность лизоцима куриного яйца // Московская международная научно-практическая конференция «Биотехнология. Вода и пищевые продукты». Москва. 2008. С. 238-239.

6. Плащина И.Г., Мартиросова Е.И., Журавлева И.Л., Петровский А.С., Лойко Н.Г., Эль-Регистан Г.И. Влияние времени инкубирования смеси лизоцима и метилрезорцина на ферментативную активность и конформационную стабильность лизоцима куриного яйца // 5-ый Международный Конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития». Москва. 2009. С. 119-120.

7. E.I. Martirosova, I.L. Zhuravleva, I.G. Plashchina, N.G. Loiko, A.S. Petrovskii, G.I. El-Registan Controlling of the catalytic activity and functionality of hen egg white lysozyme by alkylhydroxybenzenes. International Conference «Biocatalysis-2009». June 19-24 2009. P. 122-123.

8. Петровский А.С., Мартиросова Е.И. Изучение роли метилрезорцина в изменении стабильности и активности ферментных белков // Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов». Москва. 2009. С. 59-60.

9. Лойко Н.Г., Мулюкин А.Л., Нейматов А.Л., Кряжевских Н.А., Петровский А.С., Толсторожих А.Н. Структурно-пространственная организация клеток различного уровня метаболической активности // X Юбилейная Международная научно-техническая конференция «Оптические методы исследования потоков». М.: Издательский дом МЭИ. 2009. С. 382-385.

10. Петровский А.С., Лойко Н.Г., Шаненко Е.Ф., Крупянский Ю.Ф., Эль-Регистан Г.И. Влияние окисленных фенольных антиоксидантов на активность, субстратную специфичность и функциональную стабильность фермента пероксидазы // VIII Международная конференция «Биоантиоксидант». Москва. 2010. С. 365-366.

Автор выражает искреннюю признательность за ценные консультации, оказанное внимание и помощь в работе к.б.н. Н.Г. Лойко, сотрудникам лаборатории классификации и хранения уникальных микроорганизмов (Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН), к.х.н. И.Г. Плащиной, к.б.н. Е.И. Мартиросовой (Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН), д.ф.н. Ю.Ф. Крупянскому (Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН).