

РОЛЬ СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНИОН-СВЯЗЫВАЮЩИХ ЦЕНТРОВ НА БЕЛКАХ В СТАБИЛИЗАЦИИ ИХ К ТЕМПЕРАТУРНОЙ ДЕНАТУРАЦИИ И РАЗРУШЕНИЮ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТАМИ

Дурденко Е.В., Молочков Н.В., Тихоненко С.А., Сабурова Е.А.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Россия, 142290,
Пушино, ул. Институтская 3, тел. (4967)73-92-05
E-mail: ekaterina-durdenko@rambler.ru

Имеющиеся в настоящее время данные показывают, что в большинстве случаев стабильность белков в комплексе с полиэлектrolитами (ПЭ) снижается. Целью настоящего исследования являлось изучение влияния ионов фосфата на стабильность лактатдегидрогеназы (ЛДГ) к температурной денатурации и к разрушению анионным ПЭ-ом - полистиролсульфонатом (ПСС).

Показано, что ионы фосфата стабилизируют фермент к тепловой денатурации: при увеличении концентрации ионов фосфата до 50 мМ (соль натрия) начальная скорость температурной инактивации фермента замедляется более чем в 10 раз.

Исследование ферментативной активности ЛДГ в присутствии полиэлектrolита ПСС показало, что фермент полностью инактивируется в 50 мМ трис-НСI буфере при рН 6,2. Добавление ионов фосфата в концентрации 50 мМ увеличивает стабильность ЛДГ к инактивации полиэлектrolитом: если в отсутствие фосфата 50% инактивация ЛДГ происходит при концентрации ПСС 0.36 мкг/мл, то в 50 мМ фосфатном буфере концентрация ПСС увеличивается до 6 мкг/мл при том же значении рН.

Изучение триптофановой флуоресценции ЛДГ показало, что добавление ПСС тушит флуоресценцию белка в 10 раз. Изучение динамики тушения флуоресценции белка сразу после добавления ПЭ обнаружило наличие двух фаз в процессе тушения в обоих буферах: одна очень быстрая, с постоянной времени меньше сек, и вторая, более медленная, постоянная времени которой зависит от содержания ионов фосфата. Время полупревращения на медленной стадии меняется от $\tau_{1/2} \sim 2,8$ мин в отсутствие фосфата до $\tau_{1/2} \sim 21$ час в 50 мМ фосфате. Амплитуды каждой из фаз на кривых тушения флуоресценции сопоставляются с коэффициентами доступности растворителю аминокислотных остатков Trp на молекуле ЛДГ, вычисленных из данных PDB-банка по 3D-структуре ЛДГ.

Исследование спектров кругового дихроизма ЛДГ в присутствии ПСС в ближнем УФ показало, что эллиптичность белка уменьшается практически до нуля. Из спектров в дальнем УФ следует, что количество альфа-спиральных участков ЛДГ уменьшается примерно в два раза в 50 мМ трис-НСI буфере. Анализ аналогичных спектров КД в 50 мМ фосфатном буфере не обнаружил никаких изменений после добавления ПСС.

Полученные данные интерпретируются с позиции особой роли анион-связывающих центров в межсубъединичных контактах ЛДГ – два на димер, образующих с участием фосфата ионный кластер, стабилизирующий четвертичную структуру белка и соответственно стабилизирующий белок, как к тепловой денатурации, так и к разрушению полиэлектrolитом.