

РЕГУЛЯЦИЯ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ФОРМ β -ГЛЮКОЗИДАЗЫ РАСТЕНИЙ МЕТАБОЛИТАМИ И ФАКТОРАМИ СРЕДЫ

А.Н. Ершова, О.Н. Баркалова, С.Е. Долбилина

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный педагогический университет», Воронеж, Россия, aershova@vspu.ac.ru

Аннотация. Получены электрофоретически гомогенные препараты цитоплазматической и связанной с клеточными стенками β -глюкозидазы (КФ. 3.2.1.21) растений гороха. Показано, что пероксид водорода и ионы Ag^+ , Hg^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} ингибировали, а ионы Mg^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} повышали активность обоих молекулярных форм фермента. Условия гипоксии и CO_2 -среда частично снимали ингибирующее действие пероксида на β -глюкозидазу.

Ключевые слова: β -глюкозидаза, горох, ионы металлов, пероксид водорода, гипоксия

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-307-311

β -глюкозидазы (КФ. 3.2.1.21) относятся к классу гидроксил-гидролаз и участвуют в реакциях расщепления β -гликозидной связи в различных олиго-, алкил- и арилглюкозидах [Наумов, 2011]. При классификации β -глюкозидаз обычно учитывается природа агликона расщепляемых ими субстратов. Однако многие β -глюкозидазы могут обладать широкой субстратной специфичностью, что затрудняет их отнесение к определенным семействам этого класса. β -глюкозидазы участвуют в гидролизе гликолипидов, превращении цианогенных гликозидов и сапонинов, алкалоидов, флавоноидов, в проявлении активности фитогормонов, в процессах лигнификации и деградации клеточных стенок [Gerardi, 2001]. β -глюкозидазы имеют различную клеточную локализацию и их можно обнаружить в вакуолях, цитоплазме и хлоропластах растительных клеток. Кроме того, целый ряд растительных β -глюкозидаз может находиться и в связанном с клеточной стенкой состоянии [Shah, 2012].

В проростках гороха была обнаружена β -глюкозидаза, участвующая в расщеплении специфического для данного растения изосукцинимид- β -гликозида (ИС-гликозид) [Ершова, 2009]. Показано [Ершова, 2011], что в клетках данного растения присутствуют как минимум две молекулярные формы β -глюкозидазы: цитоплазматическая и связанная с клеточной стенкой. Как цитоплазматическая, так и связанная с клеточной стенкой β -глюкозидаза проявляли строгую специфичность к агликону и с наибольшей скоростью гидролизовали специфический для растений гороха ИС-гликозид, однако могли расщеплять и другие как арил- и алкилглюкопиранозиды, так и ди- и полисахариды [Ершова, 2017]. Они обладали абсолютной специфичностью к типу расщепляемой гликозидной связи и расщепляли только 1 \rightarrow 4 и 1 \rightarrow 6 β -D-глюкопиранозидные связи, но не расщепляли α -и β -D-галактопиранозидные, что было характерно для глюкозидаз других растений. Известно [Shah, 2012], что ферменты, связанные с клеточной стенкой, обычно значительно отличаются от цитоплазматических форм по своим физико-химическим параметрам. На данный момент исследованы свойства лишь незначительного количества растительных β -глюкозидаз различной клеточной локализации [Sue, 2006].

В связи с этим целью работы явилось получение высокоочищенных препаратов цитоплазматической и связанной с клеточной стенкой β -глюкозидазы растений гороха и изучения влияния различных металлов, ингибиторов и пероксида водорода, а также условий гипоксии и среды высоких концентраций диоксида углерода на активность фермента.

β -глюкозидазу выделяли из листьев 10-дневных проростков гороха, выращенных методом гидропоники при 12-часовом фотопериоде. Цитоплазматическую β -глюкозидазу выделяли из гомогената. Для связанной β -глюкозидазы использовали осадок, содержащий клеточные стенки, который обрабатывали раствором 1М NaCl. Для получения высокоочищенных препаратов цитоплазматической и связанной с клеточными стенками молекулярных форм β -глюкозидазы проводили их очистку путем высаливания сульфатом аммония и гель-хроматографии на колонках с использованием G-25 и G-100. Чистоту выделенных препаратов подтверждали методом нативного электрофореза модифицированным методом Девиса. Для определения наличия субъединиц в ферменте осуществляли электрофорез с ДДС-Na по Леммли. Активность β -глюкозидазы определяли глюкооксидазным тестом по глюкозе, а для р-НФГ по количеству отщепившегося р-нитрофенила ($\lambda=440$ нм). За единицу активности принимали количество фермента, которое расщепляло 1 мкмоль субстрата в мин при +37 °С [Ершова, 2009]. Белок определяли по Лоури. Металлы и ингибиторы вносили в среду инкубации фермента в концентрациях 0,1–10 мМ при оптимальной концентрации субстрата (5 мМ). В отдельном опыте препараты фермента выделяли из проростков, подвергнутых воздействию разных газовых сред (гипоксия, CO₂-среда) в течение 3-24 часов с последующим определением их активности.

В результате проведенной многостадийной очистки были получены ферментные препараты цитоплазматической β -глюкозидазы со степенью очистки 80.7 и удельной активностью 1477.7 Е/мг белка и связанной с клеточной стенкой β -глюкозидазы со степенью очистки – 57.9 и удельной активностью 451.7 Е/мг белка. Нативный электрофорез показал, что в результате предложенной нами схемы очистки были получены электрофоретически гомогенные ферментные препараты. Результаты ДДС-электрофореза показали, что цитоплазматическая и связанная с клеточной стенкой молекулярные формы β -глюкозидазы являются мономерами, но имеют различную электрофоретическую подвижность. Величина Rf для цитоплазматической β -глюкозидазы составила 0.39, а для связанной с клеточной стенкой – 0.86. Полученные высокоочищенные препараты цитоплазматической и связанной с клеточной стенкой β -глюкозидазы гороха были использованы в дальнейших опытах.

β -глюкозидазы не являются металлсодержащими ферментами, но часто на их активность оказывают значительное влияние ионы различных металлов [Gerardi, 2001]. На рисунке показано, что на активность как цитоплазматической, так и связанной с клеточной стенкой β -глюкозидазы растений гороха существенно влияли ионы различных металлов. Ионы Ag⁺, Hg⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Mn²⁺ оказывали ингибирующее действие на обе молекулярные формы β -глюкозидазы, снижая их активность на 50% и более. Ингибирующее влияние на β -глюкозидазу таких ионов, как Ag⁺, Hg⁺, Cu²⁺, Zn²⁺ могло быть следствием образования комплексов с сульфгидрильными, а также с карбоксильными или имидазольными группами, входящих в активные центры фермента. В то же время, такой ингибирующий эффект изученных ионов может быть обратим и легко сниматься разбавлением или обессоливанием фермента. В наших опытах добавление в среду хелатирующего агента ЭДТА в концентрации 10⁻²-10 мМ, не только не снижало активность обеих форм β -глюкозидаз, но она даже несколько возрастала, что подтверждает отсутствие в активном центре β -глюкозидазы атомов металла. Напротив, действие ионов Mg²⁺, Ca²⁺, Fe²⁺ в тех же концентрациях активировали β -глюкозидазу, что было ранее показано и для β -глюкозидаз ряда растений [Shah, 2012].

При изучении механизма катализа ферментов часто используют метод ингибиторного анализа. В связи с этим в наших опытах в среду инкубации фермента вносили р-СМВ и арсенит натрия. Как видно из приведенных данных (рисунок) в

присутствии р-СМВ активность обоих молекулярных форм фермента уменьшалась на 60-70%, что подтверждает наличие в активном центре β -глюкозидазы SH-групп. Ранее на это указывал и сильный ингибирующий эффект ионов Ag^+ , Hg^+ . Известно [Ершова, 2011], что соединения, имеющие в активном центре близкорасположенные SH-группы, имеют высокое сродство к арсениту натрия, что вызывает сильный ингибирующий эффект на активность фермента в присутствии данного ингибитора. Под действием арсенита натрия (10^{-3} М) в наших опытах активность обеих молекулярных форм β -глюкозидазы снижалась на 40-50%, что подтверждает присутствие в активных центрах не только цитоплазматического, но и связанного с клеточной стенкой фермента наличие нескольких, близко расположенных SH-групп.

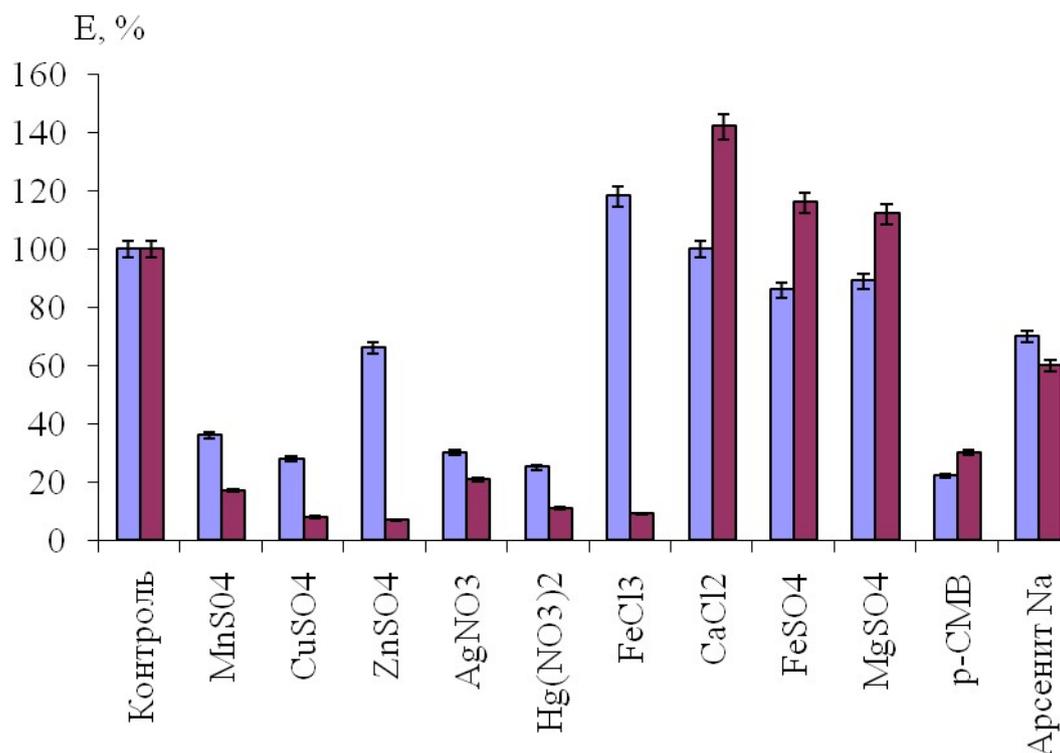


Рисунок. Влияние ингибиторов и ионов металлов на активность цитоплазматической (а) и связанной с клеточной стенкой (б) β -глюкозидазы растений гороха.

Пероксид водорода является предшественником одной из наиболее агрессивных форм АФК – гидроксильного радикала, который накапливается в различных стрессовых условиях, включая гипоксию [Ершова, 2009]. В связи с этим, было проведено исследование влияния пероксида водорода в концентрации 0,1-2 мМ на активность цитоплазматической и связанной с клеточными стенками β -глюкозидазы растений гороха, подвергнутых действию газовых сред. При этом в качестве субстрата использовали р-НФГ. Было показано, что пероксид водорода ингибировал активность фермента как при аэрации, так в условиях дефицита кислорода. Для цитоплазматической β -глюкозидазы растений, подвергнутых воздействию CO_2 -среды, отмечалось самое сильное ингибирование активности фермента (почти в 3 раза). В то же время, при обычной аэрации, как и при гипоксии, активность цитоплазматической β -глюкозидазы с увеличением концентрации пероксида водорода до 2 мМ уменьшалась на 60-65%. Для связанной с клеточной стенкой β -глюкозидазы присутствие в среде пероксида водорода даже в низкой концентрации (0,1-0,5 мМ), снижало активность

фермента почти вдвое. При увеличении концентрации пероксида водорода до 1 мМ активность фермента падала уже на 70%. В то же время в условиях гипоксического стресса и действии CO₂-среды отмечалась некоторая стабилизация активности фермента. Активность связанной с клеточной стенкой β-глюкозидазы сохранялась после действия гипоксии и CO₂-среды на проростки гороха в присутствии даже 1 мМ пероксида водорода на уровне 40%.

Проведенные нами исследования показали, что молекулярные формы β-глюкозидазы растений гороха отличаются величиной электрофоретической подвижности. При этом активность цитоплазматической и связанной с клеточной стенкой β-глюкозидазы подавлялась ионами Ag⁺, Hg⁺, Cu²⁺, Zn²⁺ также в разной степени. Установлено, что активирующее влияние ионов Mg²⁺, Ca²⁺, Fe²⁺ проявлялось в большей степени у связанной с клеточной стенкой молекулярной формой, чем у цитоплазматической формы β-глюкозидазы. Пероксид водорода подавлял активность связанной с клеточной стенкой β-глюкозидазы в условиях различной аэрации более значительно, чем это наблюдалось для цитоплазматической формы фермента. Полученные данные свидетельствуют о значительных различиях физико-химических свойств исследуемых молекулярных форм β-глюкозидазы растений гороха. Отмеченное ингибирование их активности р-СМВ и арсенитом натрия свидетельствует о присутствии в активном центре обеих молекулярных форм фермента близко расположенных SH-групп, которые играют важную роль в акте катализа. Для связанной с клеточной стенкой формы фермента это показано впервые.

Литература

Ершова А.Н., Баркалова О.Н. Выделение, хроматографическая очистка и свойства β-глюкозидазы растений гороха, подвергнутых воздействию гипоксии и CO₂-среды // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2009. – Т. 9, № 5. – С. 714–721.

Ершова А.Н., Баркалова О.Н. Идентификация каталитически активных групп β-глюкозидазы растений гороха (*Pisum sativum*) // Прикладная биохимия и микробиология. – 2011. – Т. 47, № 3. – С. 259–264.

Ершова А.Н., Баркалова О.Н., Фатуллаева А.С. Физико-химические и кинетические свойства цитоплазматической и связанной с клеточной стенкой β-глюкозидазы растений гороха // Вестник Воронежского Государственного Университета. Серия Химия. Биология. Фармация. – 2017. – № 4. – С. 29–34.

Наумов Д.Г. Иерархическая классификация гликозил-гидролаз // Биохимия. – 2011. – Т. 76, № 6. – С. 764–780.

Gerardi C., Blando F., Santino A., Zacheo G. Purification and characterisation of a β-glucosidase abundantly expressed in ripe sweet cherry (*Prunus avium* L.) fruit // Plant Science. – 2001. – V. 160. – P. 795–805

Shah M.A., Chaudhuri T.K., Mishra S. Strategy for purification of aggregation prone β-glucosidases from the cell wall of yeast: a preparative scale approach // New Biotechnology. – 2012. – V. 29, No. 3. – P. 311–320.

Sue M., Yamazaki K. Molecular and structural characterization of β-d-glucosidases in wheat and rye // Plant Physiology. – 2006. – V. 141. – P. 1237–1247.

REGULATION OF MOLECULAR FORMS OF PLANT β -GLUCOSIDASE BY METABOLITES AND ENVIRONMENTAL FACTORS

A.N. Ershova, O.N. Barkalova, S.E. Dolbilina

Voronezh State Pedagogical University, Voronezh, Russia, aershova@vspu.ac.ru

Abstract. The electrophoretically homogenous samples of cytoplasmic and cell wall-bound β -glucosidase (EC. 3.2.1.21) of pea plants were obtained. It was shown that hydrogen peroxide and ions of Ag^+ , Hg^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} inhibited but ions of Mg^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} increased the activity of both molecular forms of the enzyme. Hypoxia and CO_2 -media partially eliminated inhibiting effect of peroxide on β -glucosidase.

Keywords: *β -glucosidase, pea, metal ions, hydrogen peroxide, hypoxia*