Доклады Национальной академии наук Беларуси

2015 январь–февраль Том 59 № 1

БИОЛОГИЯ

УДК 572.12;572.15;547

А. Э. САЛЕМ, М. В. ШОЛУХ

ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА НА АГРЕГАЦИЮ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ АСПАРТАТ-АМИНОТРАНСФЕРАЗЫ

(Представлено членом-корреспондентом О. Г. Давыденко)

Белорусский государственный университет, Минск *Поступило 04.02.2015*

Введение. Агрегация белков является, с одной стороны, неизбежным следствием жизнедеятельности клетки, с другой – может быть результатом воздействия различных химических или физических факторов и представляет собой серьезную биомедицинскую проблему. Например, уменьшение агрегации белков в естественных условиях важно для предотвращения таких заболеваний, как серповидно-клеточная анемии и болезнь Альцгеймера [1]. Велика роль агрегации белков в процессах клеточной трансформации [2]. Агрегация – важный фактор, с которым приходится считаться в различных фармацевтических и биотехнологических процессах получения рекомбинантных антител, гормонов, цитокинов [3], в производстве лекарственных средств, биодатчиков, в пищевой промышленности [4]. Существует мнение, что решение проблемы агрегации белков может быть достигнуто посредством повышения структурной стабильности белковой молекулы. Для предотвращения агрегации к настоящему времени предложено использовать широкий спектр различных химических соединений. Однако все они обладают наряду с неоспоримыми достоинствами существенными недостатками [5]. В последнее время внимание исследователей привлекла проблема конформационной стабильности белков при их взаимодействии с наноматериалами. Ранее нами было установлено, что при взаимодействии митохондриальной аспартат-аминотрансферазы (мАспАТ) с наночастицами (НЧ) TiO_2 и магнетита происходит снижение ферментативной активности, изменение константы Михаэлиса, повышается термостабильность мАспАТ [6; 7]. Вместе с тем роль наночастиц коллоидного золота (НЧЗ) в развитии процесса агрегации олигомерных белков практически не изучена.

Цель работы – исследование действия НЧЗ на зависимый от температуры процесс агрегации мАспАТ.

Материалы и методы исследования. Реактивы: аспарагиновая кислота, малат дегидрогеназа, α-кетоглутарат, НАДН, TEMED, ЭДТА · $2H_2O$ (Sigma, США). СМ-сефадекс С-50, сефадекс G-100, DEAE-сефароза FF (Amarchan Biosciences, Великобритания), персульфат аммония (J. T. Baker, США), додецилсульфат натрия, акриламид, бисакриламид, реагент Фолина, глицин, дитиотреитол (AppliChem, Германия), пиридоксаль-5′-фосфат (Loba Chemie, Австрия), тимерозол (Merck-Schuhardt, Германия). Наночастицы коллоидного золота с гидродинамическим радиусом 16–18 нм были синтезированы и любезно предоставлены Н. В. Голубом (Институт биохимии им. А. Н. Баха РАН, Москва, Россия).

мАспАТ выделяли из свиных сердец, как описано ранее [8]. Фермент был гомогенен по данным электрофореза в полиакриламидном геле и обладал активностью не менее 190 МЕ. Возможность взаимодействия мАспАТ с НЧЗ оценивали как описано нами ранее по изменению спектральных свойств раствора НЧЗ [9]. Влияние НЧЗ на термоагрегацию мАспАТ изучали при 320 нм и проводили следующим образом: 500 мкл раствора НЧЗ (50 мг/л) центрифугировали при 16000g 27 мин. Супернатант удаляли, а к осадку НЧ добавляли 500 мкл мАспАТ (0,5 мг/мл), на-

ходящегося в 5 ммоль/л натрий фосфатном буфере, pH 6,8 и инкубировали 40 мин для адсорбции мАспАТ на поверхности НЧ. Контролем служила проба без НЧ. Экспериментальные образцы фермента без и с НЧЗ инкубировали при 55, 60, 65, 73 °С. Степень агрегации мАспАТ оценивали по изменению поглощения при 320 нм через каждые 2 мин в течение 20 мин [10].

Зависимость термоагрегации мАспАТ от концентрации НЧЗ изучали на спектрофотометре Carry 50 Bio (Varian, Австралия) при 320 нм по следующей схеме: 500 мкл раствора НЧЗ с концентрацией 6,25, 12,5 25, 50 мг/л центрифугировали в пластиковых пробирках типа эппендорф при 16000g 27 мин для осаждения наночастиц. Супернатант удаляли, а к осадку добавляли 500 мкл раствора мАспАТ с концентрацией 0,5 мг/мл в 5,0 ммоль/л фосфатном буфере, pH 6,8. Пробы инкубировали 40 мин при комнатной температуре. Зависимость агрегации от концентрации НЧЗ исследовали при 55 °С и следующих концентрациях золота:

1) контроль – не содержал НЧЗ,
2) 6,25 мг/л,
3) 12,5 мг/л,
4) 25 мг/л,
5) 50 мг/л.

Продолжительность инкубации 20 мин. Константы скорости агрегации расчитывали по методу, предложенному Б. И. Кургановым [11]. Содержание белка оценивали методом Петерсона [12] или по поглощению при 280 нм, используя значение $A^{1\%}_{280}$ = 14,0 и определенное для мАспАТ [13].

Результаты представлены как средняя арифметическая плюс/минус стандартная ошибка средней (X ± Sx). Обработку результатов осуществляли с помощью программного обеспечения Excel или Stadia 6.0. Все эксперименты проводили как минимум пятикратно.

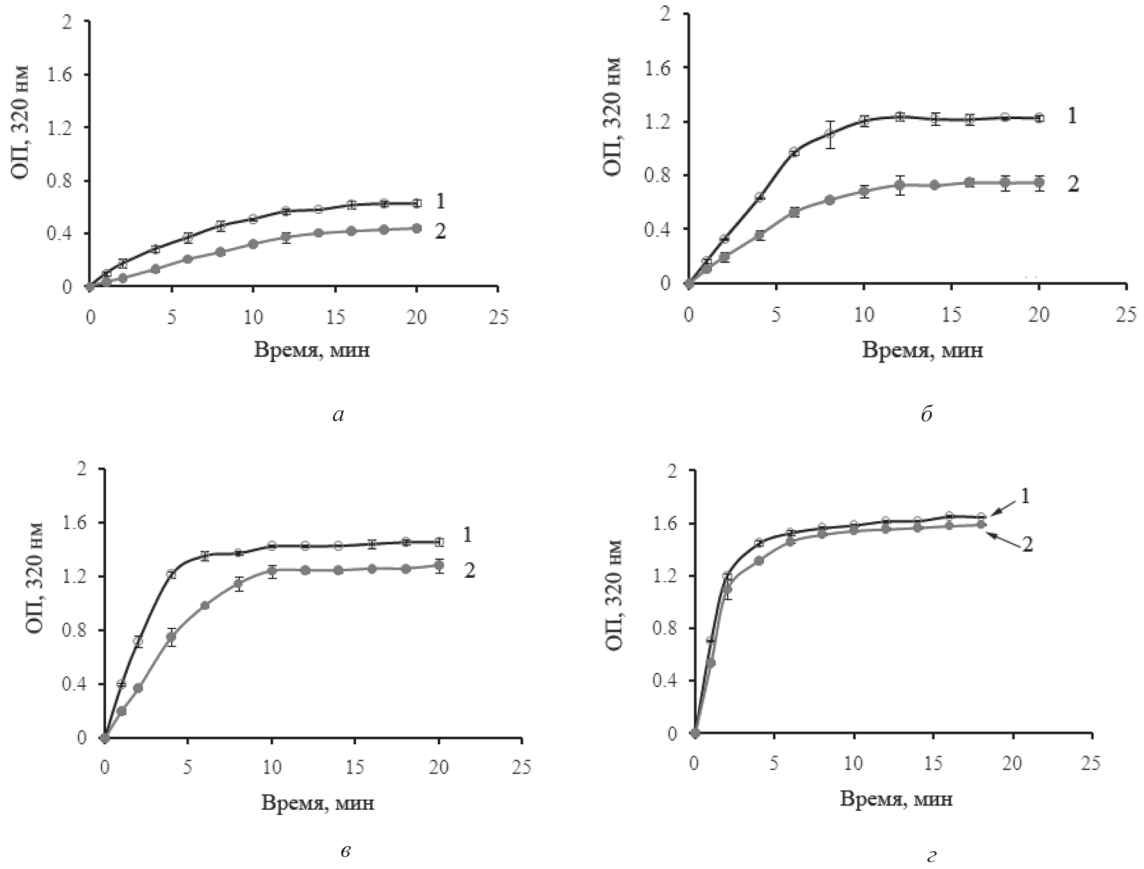

Рис 1. Зависимость агрегации мАспАТ от температуры в присутствии НЧЗ. Процесс агрегации регистрировали при длине волны 320 нм и температурах: *а* – 55 °С, *б* – 60 °С, *в* – 65 °С, *г* – 73 °С. *1* – без наночастиц золота, *2* – в присутствии наночастиц золота в конечной концентрации 50 мг/л

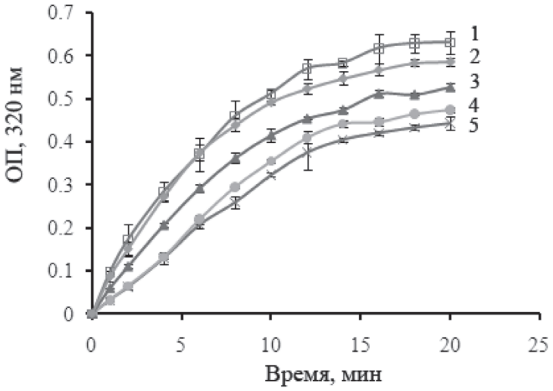

Рис. 2. Зависимость агрегации мАспАТ от концентрации НЧЗ: *1* – контроль, мАспАТ без НЧЗ; *2* – мАспАТ + НЧЗ 6,25 мг/л; *3* – мАспАТ + НЧЗ 12,5 мг/л; *4* – мАспАТ + НЧЗ 25 мг/л; *5* – мАспАТ + НЧЗ 50 мг/л. Фермент инкубировали в кювете при соответствующей температуре

Результаты и их обсуждение. В процессе выделения и очистки мАспАТ из сердца свиньи был получен гомогенный по данным SDS-электрофореза в полиакриламидном геле препарат фермента с удельной активностью 170 МЕ/мг. На первом этапе проведено исследование влияния фиксированной концентрации НЧЗ на зависимость развития агрегации от температуры (рис. 1). Установлено, что при всех исследованных температурных режимах НЧЗ снижали агрегацию мАспАТ. Так, уже при 55 °С отмечается незначительное торможение агрегации. Причем наиболее выраженный эффект, достигающий 56 %, проявлялся при температуре 60 °С. Интересно, что при этой же температуре наблюдалось и максимальное термопротекторное действие НЧ-TiO_2 [14]. После этого температурного рубежа антиагрегантное действие наночастиц начинает снижаться и при 73 °С оно практически полностью исчезает (рис. 1, *г*). Время, необходимое для достижения максимального развития процесса агрегации при повышении температуры от 55 до 73 °С, существенно сокращается. В присутствии НЧЗ данный процесс замедляется (рис. 1, *б* и *в*), что указывает на то, что выраженное аниагрегантное действие НЧЗ проявляется в ограниченном диапазоне температур.

По всей видимости, взаимодействие мАспАТ с НЧЗ приводит к фиксации фермента на поверхности НЧ и таким образом вероятность белок-белковых взаимодействий уменьшается.

На следующем этапе работы было исследована зависимость агрегации мАспАТ от концентрации НЧЗ в диапазоне от 6,25 до 50 г/л. Из результатов, представленных на рис. 2 и рис. 3, видно четкое снижение процесса агрегации при увеличении в среде инкубации концентрации НЧЗ. Для того чтобы объяснить причину данного явления обратимся к структуре мАспАТ и характеристике НЧЗ. Известно, что АспАТ состоит из двух субъединиц и включает две молекулы кофермента пиридоксальфосфата. Активный центр фермента организован двумя субъединицами и локализован на участке их взаимодействия. На карте электронной плотности фермент виден как димер с размером 105 × 60 × 50 Å [15]. Используемые в работе НЧЗ имеют значительно меньший размер. Их гидродинамический радиус равен 16–18 нм (1 Å = 10 нм). Принимая во внимание разницу в размерах НЧЗ и мАспАТ, можно предположить возможность связывания нескольких НЧЗ с молекулой фермента. Принципиальная возможность взаимодействия НЧЗ с мАспАТ была показана нами ранее [7]. Таким образом, зависимое от концентрации НЧЗ снижение агрегации мАспАТ можно объяснить увеличением количества наночастиц, связывающихся с молекулой фермента. Данное связывание может быть реализовано как через отрицательные заряды цитрата, являющегося компонентом НЧ коллоидного золота, так и за счет гидрофобной части поверхности атомов золота. Формирование связей между НЧЗ и мАспАТ будет приводить к повышению конформационной жесткости, снижать вероятность разворачивания полипептидной цепи и экспонировать на поверхности молекулы гидрофобные фрагменты, ответственные за межмолекулярное «слипание» и последующее формирование белковых агрегатов.

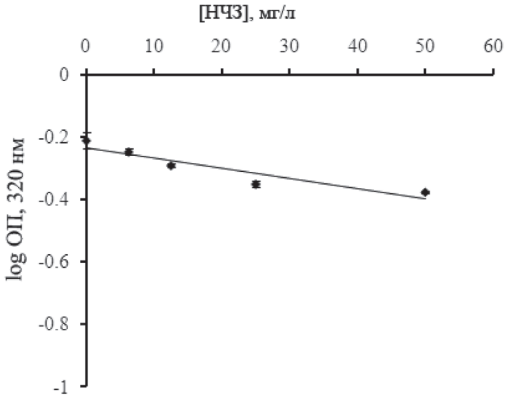

Рис. 3. Зависимость скорость агрегации мАспАТ от концентрации НЧЗ

Работа выполнена в рамках проекта БРФФИ–РФФИ (№ Б10Р-249).

Литература

1. *Merlini G. B.* et al. // Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. 2001. Vol. 39. P. 1065–1075.
2. *Liu Chen-Guang* et al. // Carbohydrate Polymers. 2005. Vol. 62. P. 293–298.
3. *Fairley S. J.* et al. // International J. of Nanomedicine. 2013. Vol. 8, N 1. P. 2085–2099.
4. *Yilma A. N.* et al. // International J. of Nanomedicine. 2013. Vol. 8. P. 2421–2432.
5. *Hamada H.* et al. // Current Pharmaceutical Biotechnology. 2009. Vol. 10. P. 400–407.
6. *Tsai De-Hao* et al. // American Chemical Society. 2011. Vol. 27, N 6. P. 2464–2477.
7. *Салем А. Э., Хорошунова Т. Н., Шолух М. В.* // Вестн. Фонда фундаментальных исследований. 2013. № 3. С. 56–62.
8. *Barra D.* et al. // Eur. J. Biochem. 1976. Vol. 64, N 2. P. 519–526.
9. *Karmen A. A.* // J. Clin. Invest. 1955. Vol. 34. P. 131–135.
10. *Agashe V. R.* et al. // Nature. 1995. Vol. 377. P. 754–757.
11. *Kurganov B. I.* et al. // Biokhimiya. 2002. Vol. 67, N 5. P. 631–640.
12. *Peterson G. L.* // Methods in enzymology. 1983. Vol. 91. P. 95–119.
13. *Layne E.* // Methods in Enzymology. 1957. Vol. 3. P. 447–455.
14. *Rosana Simón-Vázquez* et al. // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2014. Vol. 113. P. 198–206
15. *Grecor Eichele* et al. // J. Mol. Biol. 1979. Vol. 133. P. 161–180.

A. E. SALEM, M. V. SHOLUKH

ankel2008@gmail.com; sholukh@bsu.by

INFLUENCE OF GOLD NANOPARTICLES ON AGGREGATION OF MITOCHONDRIAL ASPARTATE AMINITRANSFERASE

Summary

We have studied the dependence of aggregation of mitochondrial aspartate aminotransferase (mAspAT) from the concentration of gold nanoparticles (AuNP). It has been shown that AuNPs decreased the aggregation of mAspAT in the temperature range from 55 to 73 °C. The maximal anti-aggregational effect of AuNP reached 56 % and was observed at 60 °C. Increase of AuNP concentration led to a decrease of the constant rate of enzyme aggregation. We suggest here that interaction between Au-NPs and mAspAT increases conformational stability of the enzyme molecule. It also reduces the probability of polypeptide chain unfolding, which causes exposure of hydrophobic patches on the protein surface resulting in intra molecular adhesion followed by the protein aggregation.