

Л. С. ХАЙЛОВА, Е. Ю. МОСКАЛЕВА

**МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ВЕС И ГЕТЕРОГЕННОСТЬ
ДЕКАРБОКСИЛИРУЮЩЕГО КОМПОНЕНТА
ПИРУВАТДЕГИДРОГЕНАЗНОГО КОМПЛЕКСА
ИЗ ГРУДНОЙ МЫШЦЫ ГОЛУБЯ**

(Представлено академиком С. Е. Севериным 17 XII 1969)

Пируватдегидрогеназный комплекс (ПД) из грудной мышцы голубя, катализирующий окислительное декарбоксилирование пировиноградной кислоты, был разделен в нашей лаборатории на индивидуальные ферменты: пируватдекарбоксилазу (ПДК), липоаттрансацилазу (ЛТА) и липоатдегидрогеназу (ЛДГ) (¹, ²). Все эти ферменты были получены в гомогенном при седиментационном анализе состоянии с коэффициентами седиментации: ПДК 7,8S; ЛТА 27S; ЛДГ 6,1S. В настоящей работе приводятся данные о молекулярном весе и неоднородности препарата ПДК, полученные при исследовании фермента методом гельфильтрации.

Методика. Пируватдекарбоксилазу получали по методу, описанному ранее (²). Ферментативную активность определяли по окислению пирувата в присутствии искусственного акцептора электронов — 2,6-дихлорфенолиндифенола (³).

Молекулярный вес фермента находили методом гельфильтрации (⁴, ⁵). Колонку размером 1,2 × 60 см заполняли сефадексом Г-200, набухавшим в течение 2 недель в 0,05 M фосфатном буфере рН 7,0, содержавшем 0,1 M KCl. Этот же буфер применяли при уравнивании колонки и при элюции. Все операции по определению молекулярного веса проводили при 3°.

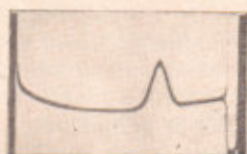


Рис. 1. Седиментограмма препарата ПДК, используемого при определении молекулярного веса. Концентрация белка 5,6 мг/мл. Скорость вращения ротора 59 780 об/мин. Снимок сделан через 60 мин. после достижения указанной скорости (ультрацентрифуга Spinco Beckman E)

Промывание сефадекса и хроматографию осуществляли при давлении 100—150 мм. Образцы белка растворяли в 1,5 мл буфера, содержащего 5% сахарозы, и помещали в верхнюю часть колонки, подслаивая под слой буфера. Элюат собирали по 1,5—2 мл при скорости протекания 8 мл/час·см². Для калибровки колонки были использованы следующие белки-свидетели:

	Моля. вес	Источник
1. Гемоглобин	68 000	(⁶)
2. Гексокиназа из дрожжей	96 000	То же
3. Дегидрогеназа 3-фосфоглицеринового альдегида из дрожжей	122 000—	
4. Лактатдегидрогеназа, М-изозим из сердца свиньи	140 000	» »
5. Альдолаза из мышц кролика	147 000	
	180 000	» »
6. Пируваткиназа из мышц кролика	237 000	(⁷)

Белок определяли спектрофотометрически по поглощению при 215 или 280 м μ , гемоглобин — при 410 м μ , голубой декстран, используемый для определения внешнего объема колонки v_0 — при 600 м μ (4). Исследуя поведение ПДК при гельфильтрации, определяли также удельную активность для каждой фракции. Элюирующие объемы белков-свидетелей v_e находили по положению пиков белка на элюционных диаграммах. По полученным данным строили калибровочную прямую, откладывая по оси абсцисс десятичный логарифм молекулярного веса, а по оси ординат v_e .

Результаты. При определении молекулярного веса мы использовали препараты фермента, очищенные на сефадексе и гомогенные при седиментационном анализе (рис. 1). Однако выяснилось, что как при очистке, так и при повторной хроматографии ПДК на геле белковому пику соответствует несколько пиков активности. При очистке фермента на хроматограмме были видны слабо

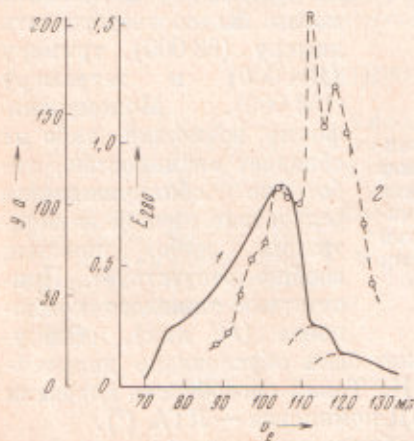


Рис. 2

Рис. 2. Элюционная диаграмма препарата ПДК при очистке на сефадексе Г-200. Размер колонки 2,2 \times 63 см. Количество наносимого белка 25 мг. 1 — поглощение белка при 280 м μ , 2 — удельная активность ПДК

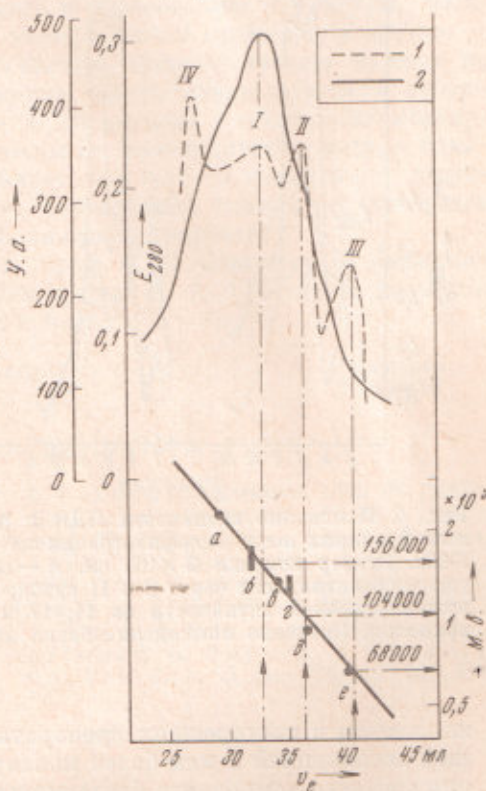


Рис. 3

Рис. 3. Элюционная диаграмма, полученная при определении молекулярного веса ПДК. Гельфильтрация на сефадексе Г-200. 1 — удельная активность ПДК, 2 — поглощение белка при 280 м μ ; внизу — зависимость элюирующего объема от молекулярного веса белка (а — пируваткиназа, б — альдолаза, в — лактат ДГ (М), г — ГАДФ, д — гексокиназа, е — гемоглобин)

дифференцированные пики белка, соответствовавшие трем максимумам активности (рис. 2). Два из них находились в области ничтожной концентрации белка. При повторном пропускании препарата через гель гетерогенность препарата выявлялась вновь. В большинстве случаев разделение препарата по белку не наблюдалось при гельфильтрации; единственный пик белка (рис. 3) совпадал с одним максимумом активности (I), два других максимума (II, III) находились на правом склоне белкового пика, а один (IV) — на левом, в областях с малой концентрацией белка. Такая картина элюции весьма характерна для высокоочищенных препаратов ПДК.

Исходя из полученной хроматограммы и построенной калибровочной прямой, мы определили, каким молекулярным весом характеризуется

каждый из пиков активности. Для пиков I—III были найдены величины 156 000; 104 000; 68 000 соответственно. IV пик активности, принадлежащий наиболее тяжелому компоненту, с молекулярным весом более 200 000, охарактеризовать точно, пользуясь калибровочной кривой, построенной для данного сефадекса, невозможно. В то же время этот максимум обнаруживается в постаревших препаратах и является менее типичным.

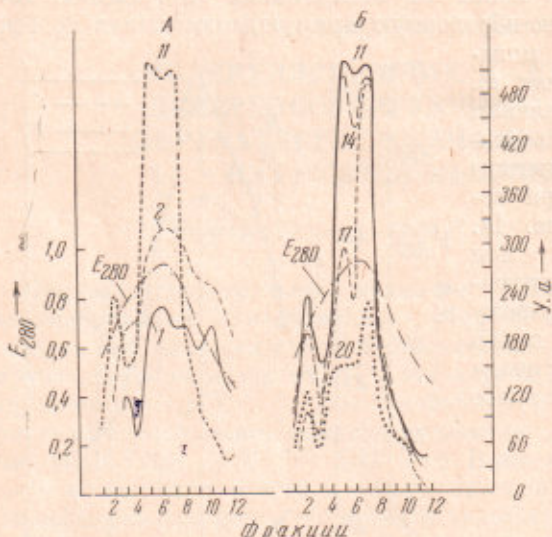


Рис. 4. Изменение активности ПДК в элюированных фракциях после гелифльтрации на сефадексе Г-200. Размер колонки 2×100 см. А — повышение удельной активности через 2 и 11 суток; Б — понижение удельной активности на 14; 17 и 20 сутки хранения. Показано поглощение белка при 280 м μ

живаемого в постаревших препаратах, может быть обусловлено дальнейшей ассоциацией 2 или более молекул ПДК. Такая способность доказана для среднего компонента бактериального ПД-комплекса — ЛТА (8).

Возникает вопрос о том, вызвана ли наблюдаемая диссоциация фермента на субъединицы взаимодействием с сефадексом (9), является ли она результатом разведения, как это имеет место в случае α -химотрипсина (10), оксидазы *d*-аминокислот (11) или глутаматдегидрогеназы (12), или же существует некоторое равновесие этих форм в растворе белка. Имеющиеся данные не позволяют с определенностью ответить на этот вопрос. Можно лишь утверждать, что подобная диссоциация не есть следствие обработки фермента бромидом, так как ПДК, полученная способом, исключающим обработку галогенидами, в аналогичных опытах обнаруживает сходный профиль элюции. Количественное распределение препарата таково, что основная часть белка связана с пиком I (156 000), а две другие формы ПДК — пик II и пик III — в большинстве препаратов присутствуют в виде незначительной примеси. Исходя из этого, мы считаем, что форма с молекулярным весом 156 000 может рассматриваться как основная.

При постановке другой серии опытов, где активность фракций ПДК, элюированных с колонки, наполненной гелем, и хранившихся при 0°, определялась во времени в течение 20 суток, замечено колебание уровня активности в пиках. На рис. 4, суммирующем данные этого эксперимента, видно, что активность сначала увеличивается более чем в два раза, затем снижается в разных пиках по-разному. Кроме факта возрастания активности фермента при хранении и последующей инактивации, объясняющейся,

При сопоставлении полученных величин видно, что выделенные формы ПДК сильно различаются по молекулярному весу, находясь в приближенном соотношении 4 : 3 : 2. Если предположить, что ПДК состоит из 4 субъединиц с молекулярным весом по 35 000—40 000 для мономера, то наблюдаемые максимумы активности могли бы соответствовать димеру (68 000), тримеру (104 000) и тетрамеру (156 000). Мономерная форма, возможно, либо не обладает активностью, либо не обнаруживается вследствие низкой концентрации, либо, наконец, вообще отсутствует. Присутствие тяжелого компонента (IV пик), обнару-

по-видимому, денатурационными изменениями, привлекает к себе внимание разницей поведения ПДК в разных фракциях элюата, наблюдающаяся в эксперименте.

Если диссоциация ПДК при гельфильтрации действительно имеет место, то естественно предположить разный уровень активности и стабильности появляющихся форм; вполне вероятны также взаимные переходы между этими формами. При хранении возможны процессы диссоциации — ассоциации, приводящие сначала к образованию структуры, обладающей более высокой активностью, которая затем переходит в другую — с меньшей активностью или стабильностью. Недостаточность данных не позволяет сделать определенных выводов относительно сущности наблюдаемых явлений. Очевидно лишь, что ПДК активна в нескольких молекулярных формах, что формы эти различны по молекулярному весу, а изменяющаяся во времени активность свидетельствует об изменениях структуры фермента. Все это указывает на возможность тонких регуляторных механизмов при участии ПДК в метаболических процессах.

Приносим глубокую благодарность проф. С. Е. Северину за внимание к данной работе и ценные советы. Благодарим А. А. Глемжа за полезное обсуждение результатов, изложенных в статье.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
3 XII 1969

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. А. Глемжа, Л. С. Зильбер, С. Е. Северин, Биохимия, 1033, 31 (1966).
- ² Л. С. Хайлова, А. А. Глемжа, С. Е. Северин, Биохимия, 35, № 3 (1970).
- ³ С. Е. Северин, А. А. Глемжа, Биохимия, 29, 1170 (1964). ⁴ P. Andrews, Biochem. J., 91, 222 (1964).
- ⁵ Т. Т. Болотина, Усп. биол. хим., 9, 141 (1968).
- ⁶ М. Диксон, Э. Уэбб, Ферменты, ИЛ, 1966.
- ⁷ G. Varron, T. P. Singer, J. Biol. Chem., 157, 221 (1945).
- ⁸ C. R. Willms et al., J. Biol. Chem., 242, 889 (1967).
- ⁹ P. Andrews, Biochem. J., 96, 595 (1965).
- ¹⁰ M. S. N. Rao, G. Kegeles, J. Am. Chem. Soc., 80, 5724 (1958).
- ¹¹ P. A. Charlwood, G. Palmer, R. Bennett, Biochim. et biophys. acta, 50, 17 (1964).
- ¹² C. Frieden, J. Biol. Chem., 234, 805 (1959).