

УДК 577.159

БИОХИМИЯ

А. И. ДОРОЖКО, З. С. КАГАН

**ВЛИЯНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ БЕЛКА НА КИНЕТИЧЕСКИЕ
СВОЙСТВА «БИОСИНТЕТИЧЕСКОЙ», L-ТРЕОНИНДЕГИДРАТАЗЫ
ИЗ БАКТЕРИИ *ESCHERICHIA COLI* K-12**

(Представлено академиком А. Е. Браунштейном 22 IX 1972)

В предыдущих сообщениях^(1, 2) было показано, что «биосинтетическая» L-трониндегидратаза из бактерии *E. coli* штамма K-12 имеет необычные кинетические свойства: при высоких значениях pH (pH > 9) на кривых зависимости начальных скоростей реакции (v) от начальных концентраций субстрата ($[S]_0$) обнаружаются четыре точки перегиба (два промежуточных плато). Эти данные трактовались нами в рамках модели строения и функционирования аллостерических ферментов по Коуланду⁽³⁾. Между тем в настоящее время становится ясным, что при анализе кинетического поведения регуляторных ферментов следует учитывать способность их к обратимой диссоциации, степень которой контролируется аллостерическими лигандами. Диссоциирующие аллостерические ферменты обладают двумя характерными кинетическими особенностями: во-первых, форма кривых зависимости v от $[S]_0$ и v от начальной концентрации аллостерического эффектора зависит от концентрации фермента^(4, 5) и, во-вторых, от концентрации фермента зависит его аллостерическая чувствительность⁽⁶⁾. Кинетические эффекты, связанные со смещением равновесия под действием аллостерических лигандов, между олигомерными формами фермента, различающимися по степени агрегации (т. е. по молекулярному весу) и по удельной каталитической активности, могут быть выявлены на основе систематического изучения кинетического поведения диссоциирующего регуляторного фермента при различных концентрациях ферментного белка⁽⁷⁾. Для учета возможного вклада эффектов диссоциации в необычное кинетическое поведение «биосинтетической» L-трониндегидратазы из бактерии *E. coli* K-12 нами было изучено влияние концентрации ферментного белка на форму кривых зависимости v от $[S]_0$ и v от начальной концентрации аллостерического ингибитора ($[I]_0$).

В качестве источника фермента служил экстракт из клеток этой бактерии. Клетки выращивали и экстракт получали так, как это описано в работе⁽¹⁾. Ферментативную активность определяли по количеству образующейся в результате L-трониндегидратазной реакции α -кетомасляной кислоты при помощи вспомогательной лактатдегидрогеназной системы после прекращения первой реакции. Состав реакционной смеси и процедура определения были такими же, как описано в предыдущем сообщении⁽¹⁾. Белок определяли по методу Лоури. За единицу активности (начальной скорости реакции) принимали такое количество белка, которое катализирует образование 1 мкмоля α -кетомасляной кислоты за 1 мин. при 26°; удельную активность фермента (a) выражали как количество единиц активности, отнесенное к 1 мг белка.

На рис. 1A показан тот многократно воспроизводящийся факт, что форма кривых зависимости a от $[S]_0$ в сильной степени зависит от концентрации ферментного белка. При определенной концентрации белка кинетическая кривая (кривая 3) имеет два характерных промежуточных плато.

При увеличении концентрации ферментного белка отмечается исчезновение плато в области низких концентраций субстрата. Второе плато (проявляющееся в области высоких концентраций субстрата) смещается при этом в область меньших концентраций L-треонина (кривые 1 и 2). При уменьшении концентрации ферментного белка (кривая 4) первое промежуточное плато проявляется более отчетливо, а второе плато, проявляясь в более широком интервале концентраций L-треонина, становится менее отчетливым. Такой характер кинетических кривых воспроизвился в многочисленных экспериментах. Следует подчеркнуть, что максимальная удельная активность фермента (a_{\max}), т. е. удельная активность при «насыщающей» концентрации субстрата, не зависит от концентрации ферментного белка. Из этого последнего факта вытекает вывод, имеющий методологическое значение: изменение удельной активности фермента от его концентрации можно заметить лишь при использовании концентраций субстрата ниже «насыщающих». Рассмотрение всех экспериментальных данных, приведенных на рис. 1, показывает, что обнаруженная нами (1, 2) сложная форма кинетических кривых не связана с возможным наличием в неочищеннем экстракте из клеток бактерии *E. coli* нескольких изоферментов «биосинтетической» L-треопиндегидратазы, каждый из которых характеризуется различным сродством к субстрату (т. е. различной величиной K_m) и различной величиной каталитической константы (k_c). Действительно, при наличии в экстракте смеси таких изоферментов кинетические кривые должны были бы иметь одинаковую форму при разведении ферментного белка. Следовательно, наиболее вероятное предположение, объясняющее полученные данные, заключается в изменении олигомерного состояния молекулы фермента: при разведении ферментного белка олигомер диссоциирует на каталитически менее активные субформы. Учитывая сложный характер полученных кинетических кривых, мы предполагаем, что таких промежуточных олигомерных форм должно быть несколько. Субстрат смещает равновесие между этими олигомерными формами, что отвечает модели регуляторного диссоциирующего фермента (7). Смещение равновесия под действием субстрата в данном случае происходит в сторону образования каталитически более активной (и, вероятно, более высокомолекулярной) формы, о чем свидетельствует неизменная величина a_{\max} для разных концентраций ферментного белка.

В связи с изменением формы кинетической кривой в зависимости от концентрации фермента нам казалось важным исследовать влияние аллостерического ингибитора L-изолейцина на характер зависимости a от $[S]_0$ при разных концентрациях ферментного белка. Как видно из рис. 1Б, при pH 9,5 L-изолейцин в концентрации $2 \cdot 10^{-4} M$ устраняет промежуточное плато на кривой зависимости a от $[S]_0$ при высокой концентрации ферментного белка, тем самым активируя фермент в области высоких концентраций субстрата, при которых выявляется второе промежуточное плато; величина a_{\max} при этом не изменяется (кривые 1 и 1'). Наоборот, при более низкой концентрации ферментного белка (кривые 2 и 2') L-изолейцин устраивает первое промежуточное плато, выявляемое при низкой концентрации субстрата, и не влияет или несколько удлиняет второе промежуточное плато в области высоких концентраций субстрата. Такое двойственное влияние L-изолейцина свидетельствует о том, что этот аллостерический ингибитор влияет как на состояние равновесия между олигомерными формами, так и на взаимодействие субъединиц в составе самого олигомера.

На рис. 1Б представлена зависимость относительных удельных активностей фермента (a_i/a , где a_i — удельная активность в присутствии L-изолейцина) от концентрации аллостерического ингибитора при трех концентрациях ферментного белка. Следует указать, что в этих опытах мы использовали такую концентрацию L-треонина, при которой на кривой зависимости a от $[S]_0$ отмечается появление второго промежуточного плато при двух концентрациях ферментного белка (рис. 1Б). Из рис. 1Б видно, что

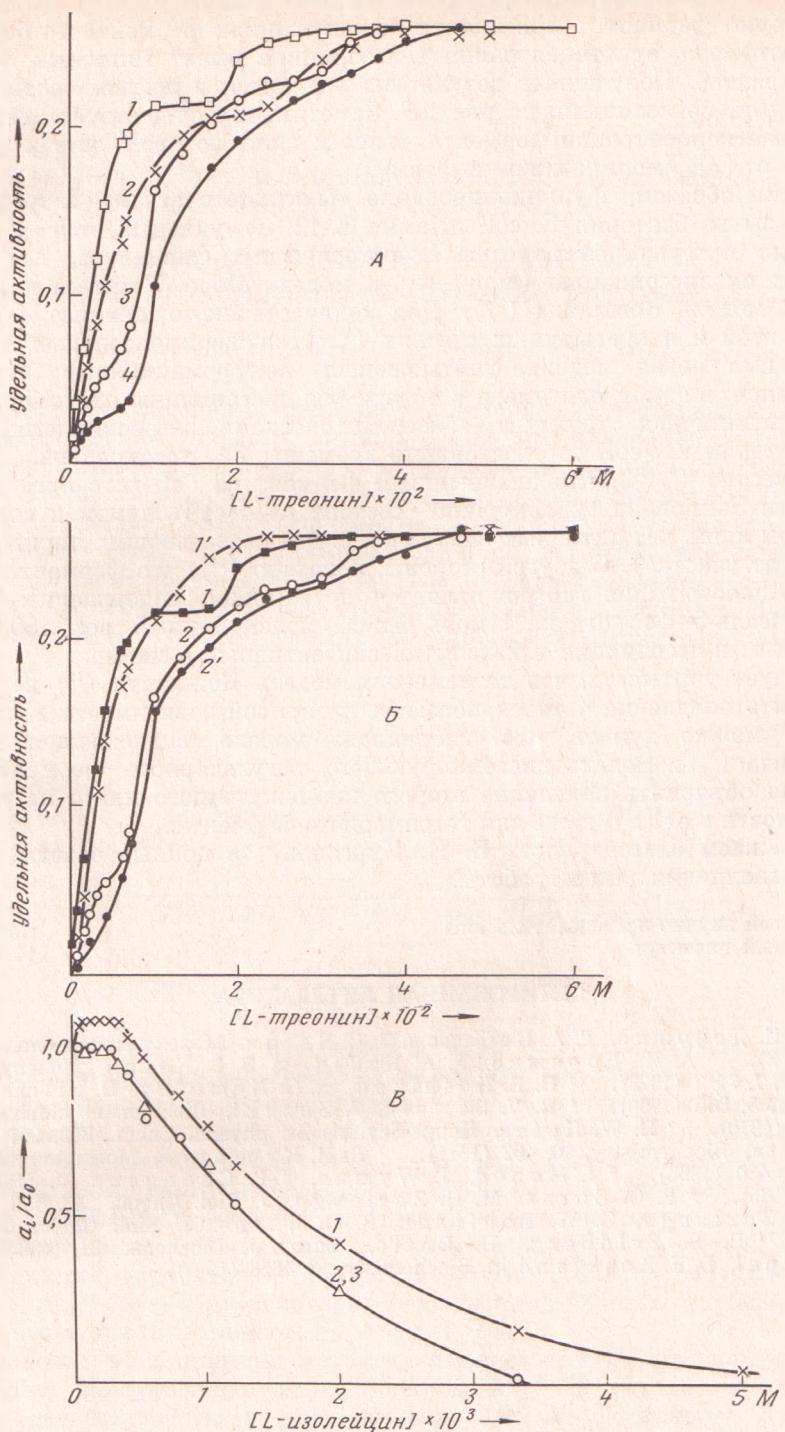


Рис. 1. Зависимость удельной активности «биосинтетической» L-треониндегидратазы из бактерии *E. coli* штамма K-12 при pH 9,5 от концентрации: A — субстрата (L-треонина) при различных концентрациях ферментного белка: 0,500 (1), 0,090 (2), 0,028 (3) и 0,010 мг/мл (4); Б — субстрата при различных концентрациях ферментного белка (1 и 1' — 0,500, 2 и 2' — 0,028 мг/мл) в присутствии (1' и 2') и в отсутствии (1 и 2) L-изолейцина ($2 \cdot 10^{-4}$ M); В — L-изолейцина при различных концентрациях ферментного белка (1 — 0,360, 2 — 0,090, 3 — 0,028 мг/мл). Концентрация L-треонина $1,66 \cdot 10^{-2}$ M

при высокой концентрации фермента низкие концентрации L-изолейцина активируют фермент, а при низких концентрациях ферментного белка зависимость a_i / a от концентрации L-изолейцина имеет типичный S-образный характер. Полученные результаты находятся в полном соответствии с данными, показанными на рис. 1Б. Заметим, что существует, вероятно, пороговая концентрация фермента, выше и ниже которой кривая зависимости v от $[I]_0$ имеет различную форму.

Таким образом, функционирование «биосинтетической» L-трониндегидратазы из бактерии *E. coli* штамма K-12 не укладывается в модели строения и функционирования аллостерических ферментов, не учитывающих их диссоциацию (например, в модель Моно, Уаймена и Шанжэя⁽⁸⁾ и в модель Кошланда⁽³⁾). Для количественного анализа, полученного в этой и в предыдущих статьях^(1, 2), экспериментальных данных необходима новая модель, учитывающая конформационные переходы двух типов: в самом олигомере и обратимую диссоциацию олигомера.

Субъединичная структура «биосинтетической» L-трониндегидратазы из бактерии *E. coli* до настоящего времени не установлена. Между тем известно^(9, 10), что аналогичный фермент из близкого организма — бактерии *Salmonella typhimurium* — состоит из 4 субъединиц и содержит при этом лишь два активных центра (т. е. два связывающих пиридоксаль-5'-фосфат участка). С другой стороны, показано⁽¹¹⁾, что фермент из бактерии *Rhodospirillum rubrum* является тетramerом, содержащим 4 моля пиридоксаль-5'-фосфата на 1 моль белка (молекулярный вес 180 000) и способным к ассоциации в каталитически активный октамер.

Следует учитывать, что тетрамерная модель Кошланда⁽¹²⁾ не может объяснить появление 4 точек перегиба на кривой зависимости v от $[S]_0$. Однако можно думать, что «гибридная» модель, включающая модель Кошланда⁽³⁾ и модель диссоциирующего регуляторного фермента⁽⁷⁾, способна объяснить появление второго промежуточного плато на кривых зависимости v от $[S]_0$ даже для тетрамерного фермента.

Выражаем благодарность Б. И. Курганову за ценные советы в процессе выполнения данной работы.

Всесоюзный научно-исследовательский
витаминный институт
Москва

Поступило
14 IX 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. И. Дорожко, Г. А. Кабанов, З. С. Каган, Молекулярная биология, 7, № 2 (1973). ² А. И. Дорожко, Г. А. Кабанов, З. С. Каган, Молекулярная биология, 7, № 3 (1973). ³ D. E. Koshland jr., G. Némethy, D. Filmger, Biochemistry, 5, 365 (1966). ⁴ R. V. Sawula, J. Suzuki, Biochim. et biophys. acta, 40, 1096 (1970). ⁵ H. W. Hofer, Hoppe-Seyler's Zs. physiol. Chem., 352, 997 (1971). ⁶ P. Datta, Biochemistry, 10, 402 (1971). ⁷ Б. И. Курганов, Молекулярная биология, 2, 430 (1968). ⁸ J. Monod, J. Wyman, J.-P. Changeux, J. Mol. Biol., 12, 88 (1965). ⁹ R. O. Burns, M. H. Zarlengo, J. Biol. Chem., 243, 178 (1968). ¹⁰ M. H. Zarlengo, G. W. Robinson, R. O. Burns, J. Biol. Chem., 243, 186 (1968). ¹¹ R. S. Feldberg, D. Datta, Europ. J. Biochem., 21, 438 (1971). ¹² J. Teipel, D. E. Koshland jr., Biochemistry, 8, 4656 (1969).