

УДК 577.154

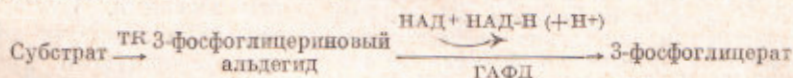
БИОХИМИЯ

Г. А. КОЧЕТОВ, Л. И. НИКИТУШКИНА, Н. Н. ЧЕРНОВ
**КОМПЛЕКС ФУНКЦИОНАЛЬНО СВЯЗАННЫХ
ФЕРМЕНТОВ — ТРАНСКЕТОЛАЗЫ
И ГЛИЦЕРАЛЬДЕГИДФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ**

(Представлено академиком С. Е. Севериным 9 III 1970)

В процессе выделения транскетолазы (ТК) (КФ:2.2.1.1.) из пекарских дрожжей было замечено, что во всех препаратах фермента, на всех стадиях его очистки обнаруживаются значительные количества глицеральдегидфосфатдегидрогеназы (ГАФД) (КФ:1.2.1.12). И только лишь в результате многократного переосаждения из щелочного раствора сульфата аммония удавалось получить ТК, практически свободную от ГАФД. Согласно известным физико-химическим свойствам этих ферментов (¹⁻³), они должны были легко разделиться в процессе хроматографирования на ДЭАЭ-целлюлозе (одна из стадий очистки ТК) и тем более — при фракционировании сульфатом аммония. Поэтому нами было высказано предположение, что наряду со свободными формами ТК и ГАФД в дрожжевом экстракте присутствует комплекс этих двух ферментов. При обработке щелочным раствором сульфата аммония он распадается, что и позволяет, в конечном итоге, получить ТК, свободную от ГАФД.

Транскетолазу из пекарских дрожжей выделяли по методу Рэккера и сотрудников (²). В работе использовали как кристаллический фермент, так и препараты, получаемые на разных стадиях его очистки. Активность ТК определяли спектрофотометрически по скорости восстановления НАД в следующей последовательности реакций:



Для осуществления последней реакции использовали ГАФД, полученную из мышц кролика (⁶). Смесь пентозофосфатов, которую использовали в качестве субстрата ТК, получали из рибозо-5-фосфата (⁴). Состав проб при определении транскетолазной активности (система 1) из расчета на 1 мл реакционной смеси (μ мол.): трис-буфера (рН 7,6) 75, смеси пентозофосфатов 3, арсената натрия 10, НАД 1, MgCl₂ 5, тиаминпирофосфата 0,2 и 3 ед. ГАФД из мышц кролика. Активность ГАФД определяли спектрофотометрически по скорости образования восстановленного НАД, используя в качестве субстрата 3-фосфоглицериновый альдегид (ФГА). Состав проб при определении активности ГАФД (система 2) (μ мол.) трис-буфера (рН 7,8) 75, ФГА 0,35, арсената натрия 10, НАД 1 и β-меркаптоэтаньола 10.

Ионообменную хроматографию препаратов ТК осуществляли на КМ-сефадексе К-50. Дисковый электрофорез проводили по Орнштейну (⁷) в 6% полиакриламидном геле, в системе: трис-ЭДТА — борная кислота, рН 8,9. После электрофоретического разделения белковых фракций ферментативную активность в них определяли тетразолиевым методом (⁴). Для этого

трубки геля инкубировали в системе 1 (для определения активности ТК*) или системе 2 (для определения активности ГАФД*) при 37° до появления фиолетового окрашивания соответствующих белковых зон.

На рис. 1а представлены данные хроматографического разделения препарата ТК, содержащего ГАФД. Видно наличие трех активных фракций. Фракции II и III представляют собой соответственно ГАФД и ТК. Во фракции I определяется активность обоих ферментов. Повышение concentra-

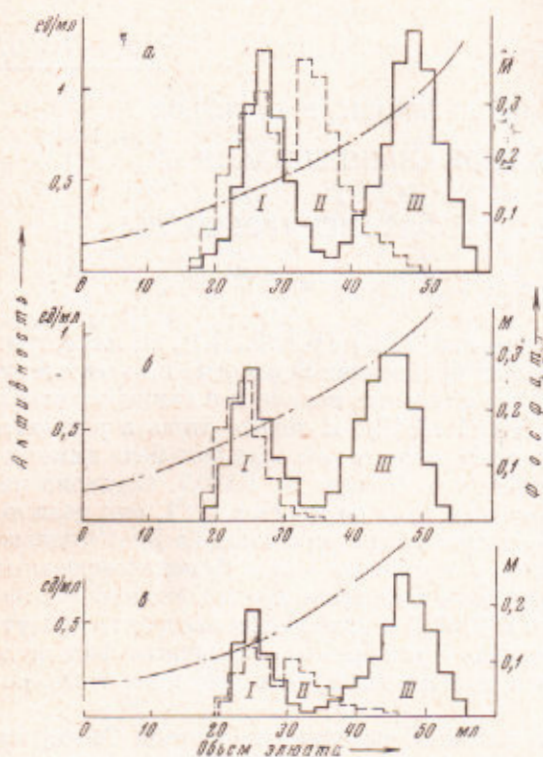


Рис. 1. Хроматографическое разделение препарата ТК, содержащего активности ГАФД. Раствор фермента наносили на колонку (0,5 × 30 см) с КМ-сефадексом К-50, уравновешенным 0,05 М фосфатным буфером, рН 5,7. Элюцию осуществляли постепенно возрастающими концентрациями фосфатного буфера (50 мл): 1 М — 0,05 М, рН 5,7. 1 — активность ТК, 2 — активность ГАФД, 3 — концентрация элюирующего фосфатного буфера. а — исходный препарат ТК (нанесено 7 мг белка); б — белковая фракция, полученная при высаливании исходного препарата ТК сульфатом аммония (60% насыщения, нанесено 4 мг); в — то же, но перед нанесением на колонку препарат выдерживался в щелочном растворе сульфата аммония (нанесено 2 мг белка)

ментальные данные можно объяснить наличием в исходном препарате фермента (рис. 1а) комплекса ТК и ГАФД, который расщепляется в процессе обработки его щелочным раствором сульфата аммония.

Существование комплекса ТК с ГАФД подтверждается также при исследовании частично очищенных препаратов методом дискового электрофореза. На рис. 2 представлены данные электрофоретического разделения

исходного фосфатного буфера (которое, согласно данным Велика и сотрудников⁽⁵⁾, должно приводить к уменьшению величины изоэлектрической точки ГАФД) резко сказывается лишь на поведении фракции II — она смещается влево и снимается с колонки значительно раньше. В то же время, профиль фракции I (где также присутствует ГАФД) остается неизменным. Безуспешной оказалась попытка разделить фракцию I и на других типах ионообменных сефадексов (при использовании различных условий хроматографирования в пределах изменения рН 5,5 — 9,5).

При 60% насыщения сульфатом аммония фракции I и III выпадают в осадок; фракция II остается в растворе. Это следует из данных, приведенных на рис. 1б, где изображены результаты хроматографического разделения белкового осадка, выпавшего при 60% насыщения сульфатом аммония. Существенно, что если хроматографирование ферментного препарата проводить не сразу (как это сделано в опыте, приведенном на рис. 1б), а после предварительного выдерживания в щелочном растворе сульфата аммония (рН 7,7), то фракция II появляется вновь (рис. 1в). Приведенные экспери-

* Каждая система включала дополнительно по 0,3 мг/мл нитроглубого тетразола и 0,03 мг/мл феназинметасульфата; кроме того, система 2 не содержала β-меркаптоэтанола.

препарата ТК, содержащего активность ГАФД, в полиакриламидном геле с последующим определением обеих ферментативных активностей. Систему 1, из которой исключен сопрягающий фермент — ГАФД мышц, мы назовем системой 3. Активности, определяемые в системах 1 и 2, принадлежат соответственно ТК и ГАФД. Активность же в системе 3 вообще не должна была определяться, так как в ней нет субстрата для ГАФД, а для ТК нет сопрягающего фермента (ГАФД), в отсутствие которого транскетолазная реакция на электрофореграмме не проявляется. Тем не менее, и в этой системе обнаруживается активность (рис. 2б). Это можно объяснить только тем, что в зоне I присутствует комплекс двух ферментов — ТК и ГАФД*. Под действием ТК образуется ФГА из смеси пентозофосфатов, который не переходит в раствор, а сразу же подвергается окислению, так как является субстратом ГАФД — второго компонента указанного комплекса ферментов. Естественно, что активность в данной зоне проявляется не только в системе 3, но и в системах 1 и 2 (рис. 2а, в), так как компоненты комплекса способны проявлять свою индивидуальную активность и независимо друг от друга. Примечательно, что ТК и ГАФД в зонах II и III расположены очень близко друг к другу, однако ни в одной из этих зон активность не проявляется в системе 3

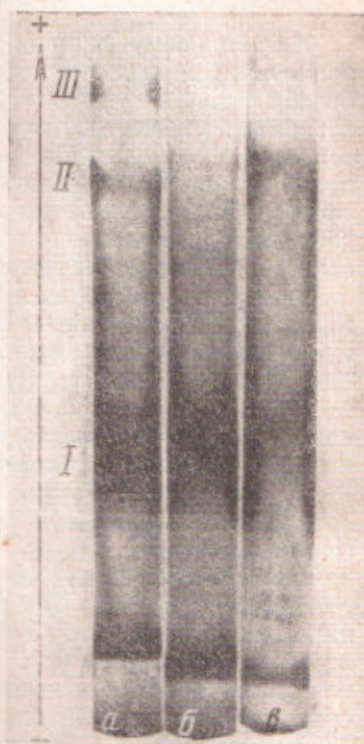


Рис. 2. Электрофоретическое разделение препарата ТК с последующим определением активности ТК и ГАФД тетразолиевым методом. Нанесено по 100 мкг белка на трубку. а — определение активности в системе 2, б — в системе 3, в — в системе 1, I—III — фракции

(рис. 2б). Это и понятно, так как под действием ТК образуется столь малое количество ФГА, что оно не может обеспечить достаточной его концентрации в растворе для проявления активности свободной ГАФД (хотя она и расположена в непосредственной близости от ТК).

В заключение мы хотели бы обратить внимание на то, что структурирование функционально связанных ферментов характерно, очевидно, не только для систем, локализованных в митохондриях и других органеллах клетки, но и для систем, присутствующих в цитоплазме.

Авторы приносят искреннюю благодарность С. Е. Северину за интерес к настоящей работе и ценные критические замечания.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
9 III 1970

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ G. de la Haba, J. G. Leder, E. Racker, *J. Biol. Chem.*, **244**, 409 (1955).
² P. A. Srere, J. R. Cooper et al., *Arch. Biochem. and Biophys.*, **74**, 295 (1958).
³ E. G. Krebs, *Methods in Enzymology*, **1**, 407 (1955). ⁴ V. K. Kirschner, B. Voigt, Hoppe — Seyler's *Zs. physiol. Chem.*, **349**, 632 (1968). ⁵ S. Velick, J. Hayes, *J. Biol. Chem.*, **203**, 545 (1953). ⁶ S. Velick, *Methods in Enzymology*, **1**, 401 (1955).
⁷ L. Ornstein, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 321 (1964). ⁸ A. A. Dietz, T. Zubranov, *Anal. Biochem.*, **20**, 246 (1967). ⁹ M. E. Kiely, E. L. Tan, T. Wood, *Canad. J. Biochem.*, **47**, 455 (1969).

* Здесь следует упомянуть о недавно вышедшей статье (*), авторы которой также предполагают существование комплекса между двумя функционально связанными ферментами — ТК и транскетолазой.