

Г. А. КОЧЕТОВ, А. Е. ИЗOTOVA

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ТИАМИНПИРОФОСФАТА С ТРАНСКЕТОЛАЗОЙ

(Представлено академиком С. Е. Севериным 16 VIII 1971)

В состав молекулы транскетолазы (ТК) пекарских дрожжей входят два атома кальция. Отщепление одного из них сопровождается падением ферментативной активности, определяемой с тиаминпирофосфатом (ТПФ). Удаление второго атома кальция влияния не оказывает. Таким образом, кофермент способен взаимодействовать с апоТК и без участия ионов металла, образуя каталитически активный холофермент ⁽¹⁾. Активность только с ТПФ составляет 60—70% от таковой, измеренной в присутствии обоих кофакторов.

Дальнейшие исследования показали, что кальций в ТК выполняет двойную функцию: повышает K_M для ТПФ и увеличивает максимальную скорость реакции. Предполагается, что в первом случае металл связывается с K_M -участком фермента, а во втором — с V -участком ⁽²⁾. Повышение каталитической активности ТК кальцием наблюдается только тогда, когда катион добавляется к апоферменту перед добавлением ТПФ или одновременно с ним. Добавление кальция после ТПФ никакого эффекта не оказывает. Это объясняют, тем что ТПФ способен взаимодействовать не только в активном центре ТК (K_M -участок), но в V -участке. Во втором случае присоединившаяся молекула ТПФ каталитически неактивна. Кроме того, она не позволяет иону кальция присоединиться в этом участке и проявить свое активирующее действие ⁽³⁾.

Насыщающая *, при обычном определении ферментативной активности, концентрация ТПФ может быть уменьшена примерно на два порядка, если активность определять не сразу после добавления ТПФ к апоТК, а после их предварительной инкубации. В этом случае весь апофермент переходит в холоТК при сопоставимых концентрациях апо- и холофермента. Полагая, что при такой постановке эксперимента ТПФ в основном будет взаимодействовать с K_M -участком, оставляя свободным V -участок, мы ожидали получить увеличение активности ТК при добавлении катиона к апоферменту, предварительно инкубированному с малыми концентрациями ТПФ.

Максимальная скорость транскетолазной реакции повышается не только кальцием, но и другими катионами, причем магнием — даже в значительно большей степени ^(2, 4). По этой причине работа проводилась с использованием магния, а не кальция. Результаты приводятся ниже.

ТК получали из пекарских дрожжей в основном по методу Рекера и сотрудников ^(5, 6). Препарат имел удельную активность 4Е/мг. Активность без добавления ТПФ практически не выявлялась, с одним ТПФ — составляла 60—70% таковой, измеренной в присутствии обоих кофакторов. Скорость транскетолазной реакции измеряли спектрофотометрически по восстановлению НАД с использованием в качестве вспомогательного фермента глицеральдегидфосфатдегидрогеназы ⁽⁷⁾. Белок определяли по методу Лоури.

* Под насыщающей концентрацией в данной работе подразумевается та концентрация кофакторов, при которой скорость транскетолазной реакции максимальна с самого начала ее измерения.

Методика. 0,35 мг ТК инкубировали с ТПФ (или с ТПФ и магнием) в 0,5 мл 0,05 *M* раствора глицил-глицинового буфера, рН 7,6, при комнатной температуре. Через определенные промежутки времени от начала инкубации отбирали пробы по 0,02 мл, переносили их в спектрофотометрическую кювету и определяли транскетолазную активность без добавления кофакторов, с добавлением только магния или ТПФ, а также обоих кофакторов вместе (во всех случаях кофакторы использовались в насыщающей концентрации: ТПФ $2,3 \cdot 10^{-4}$ *M*; магний $2,0 \cdot 10^{-3}$ *M*). Заметим, что в результате перенесения в спектрофотометрическую кювету для измерения активности инкубируемые пробы разводились в 100 раз.

Рис. 1А, Б 4 (контроль) — это результат определения транскетолазной активности с магнием и ТПФ после предварительной инкубации апофермента в отсутствие добавленных кофакторов (активность только с ТПФ также оставалась неизменной в течение всего времени проведения эксперимента). Кривые 1—3 характеризуют активность, измеренную без добавления кофакторов, после предварительной инкубации апофермента с ТПФ (рис. 1А) или с магнием и ТПФ (рис. 1Б).

Как следует из данных, приведенных на рис. 1А, уже при $2,3 \cdot 10^{-6}$ *M* концентрации ТПФ около 80% апофермента переходит в холофермент (1) и 100% — при концентрации, в 10 раз большей (2). Дальнейшее повышение концентрации кофермента эффекта не дает (3). Добавление ТПФ в кювету при определении активности сказывается лишь тогда, когда предварительная инкубация проводится с низкой концентрацией кофермента ($2,3 \cdot 10^{-8}$ *M*). Магний сам по себе никакого влияния не оказывает, в то время как при совместном добавлении с ТПФ активность увеличивается, причем во всех случаях — до уровня в контроле.

Преинкубация с ТПФ в концентрации $2,3 \cdot 10^{-6}$ мол/л — $2,3 \cdot 10^{-5}$ мол/л и магнием дает по существу тот же самый результат, что и преинкубация с одним ТПФ, как в смысле количества образующегося холофермента (ср. кривые 1, 2 на рис. 1А и Б), так и влияния кофакторов при определении ферментативной активности. Присутствие магния резко сказывается лишь при использовании высоких концентраций ТПФ в преинкубируемой системе (рис. 1Б, 3): определяемая активность высокая и одинакова при всех вариантах ее измерения — без кофакторов, с магнием, с ТПФ или обоими вместе.

Таким образом, ожидаемой активации холоТК только ионами магния ни при каких вариантах постановки опытов получить не удалось. Это нельзя объяснить тем, что ТПФ в процессе преинкубации связывается в активационном участке ТК (по нашей терминологии — V-участке), препятствуя взаимодействию с ним иона-активатора, так как при совместном добавлении магния и ТПФ эффект активации проявляется отчетливо (рис. 1А, Б). В пользу этого говорит и отсутствие влияния магния при оп-

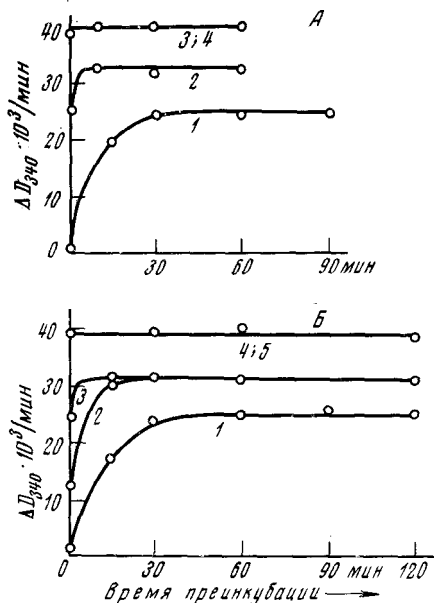


Рис. 1. Взаимодействие тиаминпирофосфата с апотранскетолазой (А) и с апотранскетолазой в присутствии магния ($2 \cdot 10^{-3}$ *M*) (Б). Концентрация ТПФ (*M*) в преинкубируемых пробах: 1 — $2,3 \cdot 10^{-6}$; 2 — $2,3 \cdot 10^{-5}$; 3 — $2,3 \cdot 10^{-4}$; 4 — без ТПФ (контроль). 5 — определение активности с добавлением обоих кофакторов после преинкубации апофермента с $2,3 \cdot 10^{-6}$ — $2,3 \cdot 10^{-4}$ *M* ТПФ

ределении активности в опытах на рис. 1Б где наличие катиона в преинкубируемых пробах должно было препятствовать взаимодействию ТПФ в активационном участке.

В принципе те же рассуждения отвергают и другую возможность, а именно: кофермент, взаимодействуя с V-участком, снижает каталитическую активность фермента, а функция иона-активатора сводится к тому, чтобы не дать возможности ТПФ соединиться в этом участке и проявить свое ингибирующее действие.

Остается третий вариант, который хорошо объясняет полученные в настоящей работе и ранее экспериментальные данные. Сущность его заключается в следующем.

В молекуле ТК имеется два активных центра. Присоединение к ним кофермента осуществляется вне зависимости от того, добавляется ли в инкубируемую пробу магний или нет. Первый центр в обоих случаях проявляет каталитическую активность, второй — только если в систему наряду с ТПФ был добавлен и магний. Поэтому, как уже указывалось выше, с насыщающей концентрацией ТПФ и магния скорость транскетолазной реакции максимальна — функционируют оба активных центра. Без магния активность снижена — функционирует только первый центр; ТПФ, связавшийся со вторым активным центром, каталитическую активность не проявляет. Сродство ТПФ к первому активному центру больше, чем ко второму, и при малой концентрации кофермента он соединяется только с первым активным центром (1, 2 на рис. 1А, Б). При высокой концентрации происходит насыщение и второго центра. Это сопровождается повышением определяемой активности, если в преинкубируемую систему был добавлен магний (рис. 1Б, 3); в противном случае она остается неизменной (рис. 1А, 3).

При наличии металла кофермент связывается прочно в обоих центрах (активность холофермента не меняется после пропускания его через сефадекс), без металла — только в первом. От второго центра ТПФ легко отщепляется даже при разведении, этим и объясняется тот факт, что даже после преинкубации апофермента с высокими концентрациями ТПФ (рис. 1А, 3) последующее добавление кофакторов при определении ферментативной активности оказывает стимулирующий эффект (рис. 1А, 5): происходит образование второго каталитически активного центра.

Итак, добавленный магний сам по себе не активирует транскетолазу, но обеспечивает образование второго каталитически активного центра фермента.

Авторы выражают глубокую благодарность акад. С. Е. Северину за интерес к работе и ценные замечания.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
19 VII 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ G. A. Kochetov, P. P. Philippov, *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **38**, 930 (1970). ² G. A. Kochetov, P. P. Philippov, *FEBS Letters*, **6**, 49 (1970). ³ Г. А. Кочетов, В сборн. Структура и функция ферментов, М., 1972. ⁴ Г. А. Кочетов, П. П. Филиппов, Р. А. Усманов, *Биохимия*, **34**, 810 (1969). ⁵ G. De la Haba, J. Leder, E. Racker, *J. Biol. Chem.*, **214**, 409 (1955). ⁶ P. A. Srege, J. Cooper et al., *Arch. Biochem. and Biophys.*, **74**, 295 (1958). ⁷ Г. А. Кочетов, К. Р. Кобылянская, *Вопр. мед. хим.*, **11**, 80 (1965).