

И. Ф. БЕЛЯЕВА, В. И. ТЕЛЕПНЕВА

КИНЕТИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ НАД-КИНАЗЫ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ КРОЛИКА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЯХ ФЕРМЕНТА

(Представлено академиком С. Е. Севериным 19 VII 1972)

В отличие от НАД-киназ (АТФ:НАД 2'-фосфотрансфераз КФ 2.7.1.23), выделенных из ряда животных и растительных тканей, а также микроорганизмов (¹⁻⁷), НАД-киназа скелетных мышц кролика, как было показано нами ранее, характеризуется сложной кинетикой (⁸), что выражается в появлении перегибов и промежуточных максимумов на кривой зависимости скорости синтеза НАДФ от концентрации НАД.

Настоящая работа посвящена исследованию кинетической характеристики фермента при различных его концентрациях. В работе использовали частично очищенные препараты НАД-киназы из скелетных мышц кролика. Очистка фермента включала высаливание $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, удаление балластных белков тепловой денатурацией и осаждение НАД-киназы на геле фосфата кальция. Удельная активность очищенных таким способом ферментных препаратов повышалась в 60–80 раз, а выход составлял 50–60% по отношению к ферменту, находящемуся в гиалоплазме мышечной ткани. Активность препаратов НАД-киназы существенно не менялась после хранения в течение 2–3 мес. в 0,25 М фосфатном буфере pH 7,5 при -15° . Синтез НАДФ осуществляли в реакционной среде, содержащей от 0,15 до 1,5 $\mu\text{моля}$ НАД, 2,3 $\mu\text{моля}$ АТФ, 10 $\mu\text{мол}$ MgCl_2 , 10 $\mu\text{мол}$ никотинамида, 50 $\mu\text{мол}$ трис-НСI-буфера pH 7,3–7,4, 45 $\mu\text{мол}$ NaF и от 0,1 до 4 мг белка ферментного препарата в общем объеме 1 мл. Инкубацию проводили при 37° в течение 1 часа. Реакцию останавливали нагреванием проб в кипящей водяной бане в течение 1 мин., НАДФ определяли в безбелковом фильтрате методом Слейтера (⁹). За единицу активности принимали количество фермента, катализирующее образование 1 $\mu\text{моля}$ НАДФ в час в данных условиях. Белок определяли микробиуретовым методом (¹⁰) и по поглощению при 280 и 260 м μ .

Во время инкубации скорость синтеза НАДФ была постоянной по крайней мере в течение 90 мин. Препараты НАД-киназы не проявляли НАД(Ф)-гликогидролазную и НАДФ-фосфатную активность. Ошибка при определении удельной активности не превышала 7%. Изучение зависимости скорости синтеза НАДФ от концентрации НАД проводили при оптимальной концентрации АТФ.

Как видно из рис. 1, форма кинетической кривой существенно образом зависит от концентрации фермента, и найденные различия наиболее резко выражены на начальных участках кривых насыщения субстратом. Так, при содержании 0,216 мг белка в инкубационной среде (1) на кривой $v(S)$ имеется промежуточный максимум в области низких концентраций субстрата. Повышение концентрации фермента в 2 раза сопровождается появлением на кривой промежуточного плато (2), а при 4-кратном повышении количества белка отрезок кривой на том же участке представляет собой сигмоиду (3). В области средних и высоких концентраций НАД кривые насыщения субстратом обнаруживают значительное сходство, хотя абсолютного совпадения хода кривых не наблюдается. Изменение характера кинетической кривой в зависимости от концентрации фермента

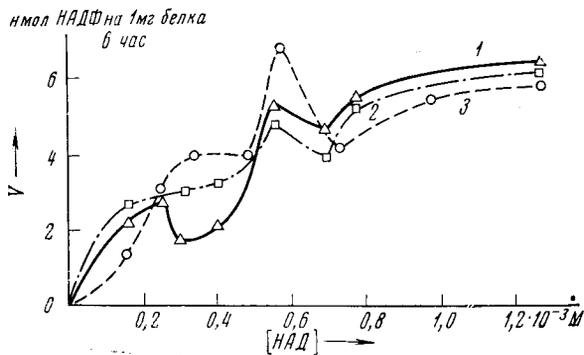


Рис. 1

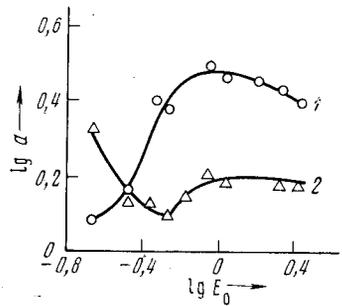


Рис. 3

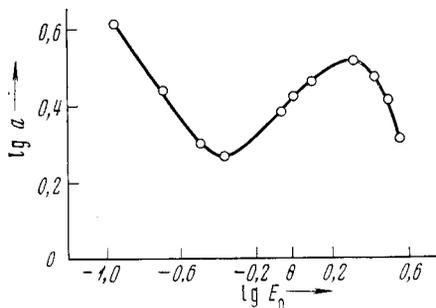


Рис. 2

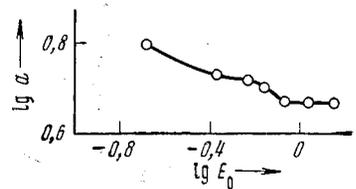


Рис. 4

Рис. 1. Зависимость кинетики насыщения субстратом от концентрации фермента. Содержание белка в инкубационной пробе: 1 — 216 $\mu\text{г}$, 2 — 432 $\mu\text{г}$, 3 — 864 $\mu\text{г}$

Рис. 2. Зависимость удельной активности НАД-киназы от концентрации фермента. Здесь и на рис. 3 и 4: a в нмолях НАДФ на мг белка в час, $[E]$ в мг/мл

Рис. 3. Зависимость удельной активности НАД-киназы от концентрации фермента при разных концентрациях субстрата. 1 — НАД $1,34 \cdot 10^{-3}$ М, 2 — НАД $0,59 \cdot 10^{-3}$ М

Рис. 4. Зависимость удельной активности постаревшего препарата НАД-киназы от концентрации фермента

указывает на существование диссоциирующей системы, в которой субстрат влияет на равновесие между олигомерными формами белка, обладающими различной ферментативной активностью. В такой системе должны наблюдаться отклонения от простых кинетических закономерностей^(11, 12).

Определенная зависимость изменения характера кривых насыщения субстратом от концентрации фермента была показана для фосфофруктокиназы и лактатдегидрогеназы скелетных мышц кролика^(13, 14).

Выявить какие-либо закономерности в изменении кинетического поведения НАД-киназы скелетных мышц при различных концентрациях фермента нам не удалось.

Проведенное нами изучение зависимости удельной активности НАД-киназы от концентрации белка показало, что форма кривой $\lg a - \lg [E_0]$ имеет сложный характер и существенным образом зависит от времени хранения препарата фермента и от степени воздействия на него процедуры замораживания и оттаивания. На рис. 2 представлена наиболее сложная форма кривой зависимости удельной активности от концентрации фермента. Для различных препаратов НАД-киназы можно было наблюдать сильно различающиеся по характеру кривые зависимости $\lg a$ от $\lg [E_0]$, которые представляли собой как бы отдельные участки сложной кривой, показанной на рис. 2. Рис. 3 демонстрирует, что характер кривой

зависимости $\lg a - \lg [E_0]$ в сильной степени определяется концентрацией НАД.

При исследовании ферментных препаратов НАД-киназы, подвергнутых длительному хранению (несколько месяцев, в течение которых их многократно замораживали и оттаивали), наблюдали упрощение формы изучаемой кривой (рис. 4). Как видно из рисунка, с повышением концентрации белка удельная активность снижается и достигает постоянной величины. Следует отметить, что упрощение формы кривой $\lg a - \lg [E_0]$ происходило без заметного снижения активности НАД-киназы. Этот факт, вероятно, указывает на то, что фермент при хранении утрачивает способность к превращениям на уровне четвертичной структуры раньше, чем происходит изменение его каталитической активности.

Описанная выше сложная зависимость удельной активности НАД-киназы от концентрации фермента не позволила нам провести кинетический анализ исследуемой системы.

Объяснение полученных нами результатов значительно затруднено в связи с отсутствием сведений относительно четвертичной структуры НАД-киназы. Однако имеющиеся в литературе данные по определению молекулярного веса препаратов НАД-киназы, выделенных из различных источников, дают основание предположить, что фермент может существовать в формах, различающихся по четвертичной структуре. Так, для НАД-киназы из печени голубя определен молекулярный вес порядка 250–270 тыс. (¹⁵, ¹), а для фермента из печени крысы — всего 35 тыс. (¹⁵). Эта же величина для фермента из *Azotobacter vinelandii* составляет 125 тыс. (¹⁶, ¹⁷). Авторы высказывают предположение, что НАД играет важную роль в поддержании нативной структуры бактериальной НАД-киназы.

Приведенные в настоящей работе сложные кривые зависимости удельной активности фермента от его концентрации, вероятно, указывают на то, что в скелетной мышце кролика присутствует равновесная система олигомерных форм фермента, обладающих различной активностью. Переход между этими формами является, очевидно, многоступенчатым процессом и регулируется как концентрацией белка, так и концентрацией субстрата. Кинетические кривые насыщения субстратом, а также кривые $\lg a - \lg [E_0]$ могут, кроме того, быть усложнены присутствием нескольких изоформ НАД-киназы. Единственным указанием на возможность существования изоферментов НАД-киназы следует признать данные Эпса, обнаружившего в дрожжевых клетках 3 различных НАД-киназы: одну цитоплазматическую и две митохондриальные (⁴).

В настоящее время нами начаты исследования по изучению четвертичной структуры НАД-киназы из скелетных мышц кролика.

Московский государственный университет
им М. В. Ломоносова

Поступило
10 VII 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ D. K. Apps, *Eur. J. Biochem.*, **5**, 444 (1968). ² I. L. Yego, B. Farinas, L. S. Dietrich, *J. Biol. Chem.*, **243**, 4885 (1968). ³ В. Л. Немчинская, Т. Б. Смирнова, *Биохимия*, **32**, в. 4, 854 (1968). ⁴ D. K. Apps, *Eur. J. Biochem.*, **13**, 233 (1970). ⁵ A. E. Chung, *J. Biol. Chem.*, **242**, 1182 (1967). ⁶ Y. Yamamoto, *Plant. Physiol.*, **41**, 523 (1966). ⁷ С. Е. Северин, В. И. Телешнева, Л. А. Цейтлин, *Биохимия*, **35**, в. 2, 329 (1970). ⁸ Н. Ф. Беляева, В. И. Телешнева, *Сборн. Витамины*, № 7 (1972); *Биохимия синтеза и обмена коферментов и коферментных витаминов*, Матер. I Всесоюз. симп. Киев, январь, 1972, Киев, 1972, стр. 6. ⁹ T. F. Slater, B. Sawyer, U. Strauli, *Arch. Intern. Physiol. Biochem.*, **72**, 427 (1964). ¹⁰ Д. Бэйли, в кн. *Методы химии белка*, М., 1965, стр. 266. ¹¹ Б. И. Курганов, *Молекулярная биология*, **2**, в. 2, 166 (1968). ¹² Б. И. Курганов, *Сборн. Аллостерическая регуляция действия ферментов*, М., 1971. ¹³ Н. Н. Wegner, *Porre-Seylers Zs. physiol. Chem.*, **352**, 997 (1971). ¹⁴ Б. И. Курганов, С. А. Суриц, Н. П. Сугрובה, *Молекулярная биология*, **2**, в. 2, 180 (1968). ¹⁵ В. Л. Немчинская, В. М. Божков, В. П. Кушнер, *Биохимия*, **35**, в. 6, 1067 (1970). ¹⁶ A. E. Chung, *Biochim. et biophys. acta.*, **159**, 490 (1968). ¹⁷ В. P. Oringer, A. E. Chung, *ibid.*, **250**, 86 (1971).