

В. И. ТЕЛЕШЕВА, И. Д. ИНСАРОВА

## ИЗУЧЕНИЕ ЧЕТВЕРТИЧНОЙ СТРУКТУРЫ НАД-КИНАЗЫ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ КРОЛИКА

(Представлено академиком С. Е. Севериным 17 V 1974)

Исследование кинетических свойств НАД-киназ (АТФ:НАД 2'-фосфотрансфераз КФ 2.7.1.23), выделенных из целого ряда источников, показало, что зависимость скорости синтеза НАДФ от концентрации субстратов для большинства изученных ферментных препаратов подчиняется уравнению Михаэлиса — Ментен (<sup>1-6</sup>). Исключение составляют три фермента: НАД-киназа из митохондрий дрожжей, фермент из яиц морского ежа и из скелетных мышц кролика. Для первого из них зависимость скорости реакции от концентрации АТФ·Mg является S-образной (<sup>7</sup>), второй характеризуется появлением промежуточного плато на кривой насыщения субстратами (<sup>8</sup>), но наиболее сложной кинетикой отличается НАД-киназа из скелетных мышц кролика (<sup>9-10</sup>). Этот фермент имеет несколько оптимумов рН и характеризуется появлением перегибов и промежуточного максимума на кривых  $V(S)$  (<sup>9</sup>). Форма таких кривых зависит от рН среды (<sup>9</sup>), от длительности хранения препарата (<sup>10</sup>) и от концентрации фермента (<sup>10</sup>). Показано также, что зависимость удельной активности от концентрации фермента не является линейной и в значительной степени изменяется в процессе хранения препарата (<sup>10</sup>). Перечисленные свойства позволили высказать предположение о возможности существования НАД-киназы из скелетных мышц кролика в виде равновесной системы олигомерных форм, отличающихся по ферментативной активности (<sup>9-10</sup>). Для обоснования подобного предположения необходимо исследование четвертичной структуры фермента. В доступной нам литературе сведения о четвертичной структуре НАД-киназ практически отсутствуют. Известны лишь молекулярные веса ферментов из печени крысы, *Azotobacter vinelandii*, из печени голубя и из яиц морского ежа, равные 35 000 (<sup>11</sup>), 125 000 (<sup>12</sup>), 250 000—270 000 (<sup>5, 11</sup>) и 310 000 (<sup>8</sup>) соответственно. Такое разнообразие молекулярных весов ферментов, катализирующих одну и ту же реакцию, указывает на возможность существования НАД-киназы в формах, различающихся по четвертичной структуре.

Настоящая работа посвящена изучению четвертичной структуры НАД-киназы скелетных мышц кролика. Очищенный в 120—150 раз фермент получали по методу, разработанному Беляевой (<sup>10</sup>), с незначительными модификациями. Синтез НАДФ осуществляли в среде, содержащей в общем объеме 1 мл следующие компоненты (в мкмол.): трис-НСl 50 (рН 7,3), НАД 3, АТФ 3, MgCl<sub>2</sub> 10 и 40—400 мкг исследуемого белка. Инкубацию и определение активности проводили в условиях, описанных ранее (<sup>10</sup>). Полученный препарат электрофоретически был гетерогенен.

Молекулярный вес фермента определяли методом тонкослойной гель-фильтрации на сефадексе G-200. Гель-фильтрацию проводили в течение 12 час. при  $4^{\circ}$  в стандартной камере на стеклянной пластинке  $20 \times 40$  см в слое сефадекса толщиной 0,5–0,6 мм, используя в качестве буферного раствора 0,25 *M* раствор калийфосфата pH 7,3. Угол наклона пластинки составлял  $8^{\circ}$ . В точку наносили около 200 мг исследуемого препарата или метчиков, растворенных в калийфосфатном буфере. По окончании разделения определяли локализацию белка, снимая с одной из частей пластинки реплику и окрашивая ее амидошварцем<sup>(13)</sup>. Со второй части пластинки счищали сефадекс в местах, соответствующих определенным пятнам белка, и элюировали 0,16 *M* трис-HCl-буфером pH 7,3 в течение 3 час. В элюатах определяли ферментативную активность.

Как видно из рис. 1, препарат НАД-киназы в процессе гели-фильтрации образует пять белковых пятен с молекулярным весом от 40 000 до 290 000. В элюатах всех этих белковых зон обнаруживается активность НАД-киназы, что указывает на присутствие в ферментном препарате несколько форм НАД-киназы с молекулярным весом от 40 000–45 000 до 280 000–300 000.

Можно было ожидать, что электрофоретическое разделение элюатов белковых зон, наиболее различающихся по молекулярному весу, обнаружит неидентичный и строго определенный набор белков, характерный для данной белковой зоны. Нами был проведен диск-электрофорез в 7% полиакриламидном геле в системе Орнштейна<sup>(14)</sup> с последующим окрашиванием белков кумасси бриллиантовым. При этом было обнаружено, что в элюатах белковых зон, различающихся по молекулярному весу, содержатся белки с одинаковой электрофоретической подвижностью ( $R_f$ ). Как видно из рис. 2, на котором представлена схема одного из разделений, к таким белкам относятся белки с  $R_f$  0,52; 0,73; 0,98. Формы с более низкой подвижностью ( $R_f$  0,1) элюируются из пятен, содержащих высокомолекулярные белки. Полученные результаты можно объяснить, исходя из представления о том, что исследуемый ферментный препарат содержит диссоциирующую систему олигомерных форм. В процессе гели-фильтрации происходит разделение этих форм по молекулярному весу, а последующая элюция, по-видимому, создает условия для перехода одних форм в другие. Следствием таких переходов может быть появление белков с одинаковой подвижностью на электрофореграммах элюатов белковых фракций, различающихся по молекулярному весу.

Повторный электрофорез белка с  $R_f$ , близким к 1, после его элюции и концентрирования дал еще одно убедительное доказательство возможности перехода одних форм в другие. Как следует из рис. 3, электрофореграмма такого элюата обнаруживает несколько белков с более низкой, чем у исходного, электрофоретической подвижностью (0,73; 0,52 и 0,1). Следовательно, белок с  $R_f$  0,98, присутствующий в элюатах всех фракций,

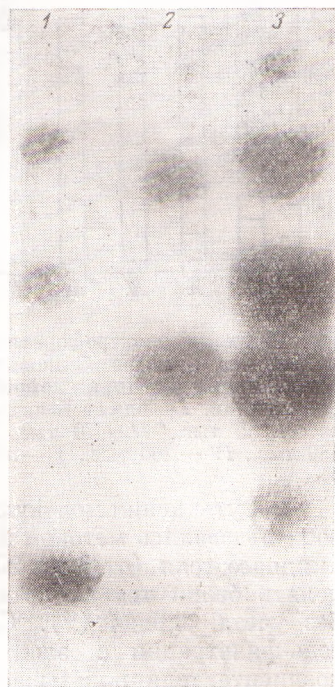


Рис. 1. Разделение препарата НАД-киназы в тонком слое сефадекса G-200. 1, 2-метчики, 3 — исследуемый препарат. 1 — химотрипсиноген, глицеральдегидфосфатдегидрогеназа, пировуваткиназа; 2 — креатинкиназа и  $\gamma$ -глобулин

в свою очередь, способен образовать при определенных условиях несколько различных форм. Иными словами, исследуемый препарат содержит равновесную систему белков, способных осуществлять взаимные переходы.

К сожалению, из-за низкой активности фермента нам не удалось выявить НАД-киназу на электрофореграммах, используя восстановление солей тетразолия в сопряженной системе. Поэтому локализацию фермента в геле определяли, измеряя активность в элюатах, полученных после разрезания геля на диски толщиной 2,5–3 мм, измельчая их с помощью ручного гомогенизатора и выдерживания в течение 12–14 час. в 0,16 М трис-НСI-буфере рН 7,3 при 4°. Оказалось, что НАД-киназной активностью обладают все четыре зоны, в которые входят белки с  $R_f$  0,4; 0,52; 0,73 и 0,98. Из приведенных выше данных тонкослойной гель-фильтрации и электрофоретического анализа препарата следует, что именно эти белки способны осуществлять взаимные переходы. Этот факт свидетельствует о том, что присутствующая в препарате диссоциирующая система является НАД-киназой.

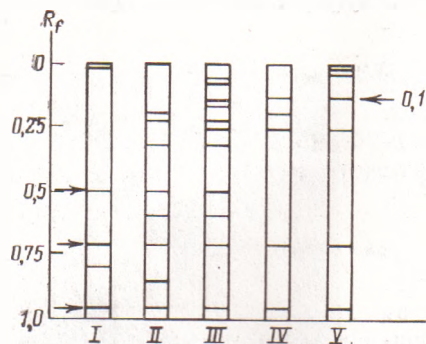


Рис. 2. Схема электрофоретического разделения элюатов белковых зон, полученных после тонкослойной гель-фильтрации. I — элюат белка с мол. весом 40 тыс., II — 70 тыс., III — 140 тыс., IV — 200 тыс., V — 300 тыс.

Для уточнения молекулярного веса олигомерных форм НАД-киназы мы воспользовались методом электрофореза в линейном градиенте полиакриламидного геля (от 3 до 20%), позволяющим разделять белки только по их молекулярному весу без учета заряда (15). Сочетание тонкослойной гель-фильтрации с электрофорезом в линейном градиенте геля показывает, что на электрофореграммах элюатов каждой из пяти белковых зон обнаруживается белок с молекулярным весом 30 000–31 000 (рис. 4), а три наиболее высокомолекулярные зоны (140 000, 200 000, 300 000) всегда дают белок с молекулярным весом 305 000–310 000.

Определение локализации НАД-киназы в столбике геля после проведения электрофореза в линейном градиенте позволило установить, что исследуемый фермент существует в формах, различающихся по молекулярному весу. Формы, которые после элюции обнаруживают НАД-киназную активность, имеют минимальный молекулярный вес 30 000–31 000, а максимальный 305 000–310 000. Активными в отношении синтеза НАДФ оказываются также элюаты белковых зон с молекулярным весом, почти кратным 30:62 000, 184 000, 240 000 и 270 000.

Проведенное исследование четвертичной структуры НАД-киназы скелетных мышц кролика позволяет сделать заключение о существовании фермента в виде диссоциирующих олигомеров, состоя-

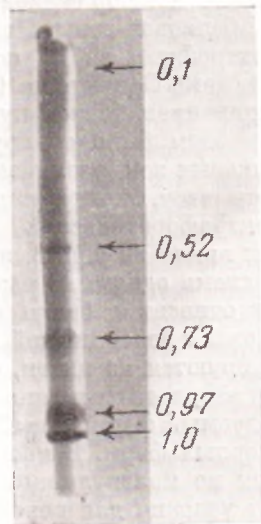


Рис. 3. Повторный электрофорез белка с электрофоретической подвижностью 0,98. Цифры — электрофоретическая подвижность полученных при 2-м разделении белков

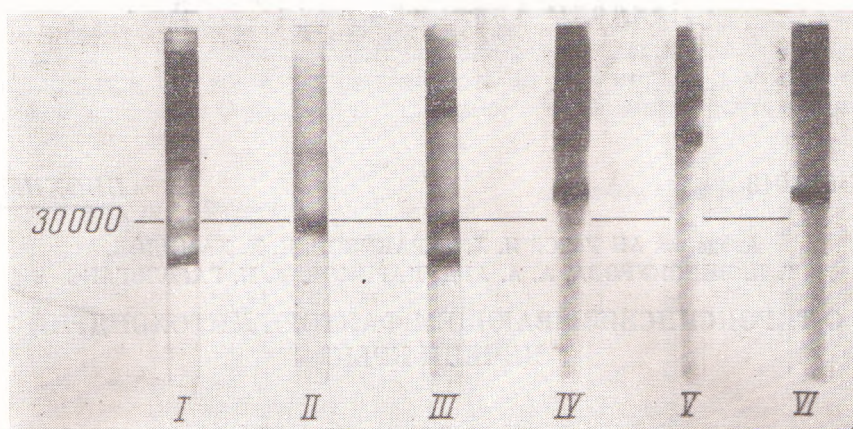


Рис. 4. Разделение элюатов белковых зон, полученных после тонкослойной гель-фильтрации, в линейном градиенте полиакриламидного геля. I — исходный препарат, II — элюат белка с мол. весом 40 тыс., III — 70 тыс., IV — 140 тыс., V — 200 тыс., VI — 300 тыс.

щих из различных сочетаний субъединиц, с молекулярным весом субъединицы, равным 30 000.

Московский государственный университет  
им. М. В. Ломоносова

Поступило  
7 V 1974

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> D. K. Apps, *Europ. J. Biochem.*, v. 5, 3, 444 (1968). <sup>2</sup> A. E. Chung, *J. Biol. Chem.*, v. 242, 6, 1182 (1967). <sup>3</sup> В. Л. Немчинская, Т. В. Смирнова, *Биохимия*, т. 32, 4, 854 (1968). <sup>4</sup> С. Е. Северин, В. И. Телупнева, Л. А. Цейтлин, *Биохимия*, т. 35, 2, 329 (1970). <sup>5</sup> J. Yamamoto, *Plant Physiol.*, v. 41, 3, 523 (1966). <sup>6</sup> I. L. Yero, B. Farinas, L. Dietrich, *J. Biol. Chem.*, v. 243, 18, 4885 (1968). <sup>7</sup> D. K. Apps, *Europ. J. Biochem.*, v. 13, 2, 223 (1970). <sup>8</sup> С. Н. Blomquist, *J. Biol. Chem.*, v. 248, 20, 7074 (1973). <sup>9</sup> Н. Ф. Беляева, В. И. Телупнева, *Сборн. Витамины*, № 7 (1972); *Биохимия синтеза и обмена коферментов и коферментных витаминов. Матер. I Всесоюзн. симп.*, Киев, январь, 1972, стр. 6. <sup>10</sup> Н. Ф. Беляева, В. И. Телупнева, *ДАН*, т. 209, 4, 977 (1973). <sup>11</sup> В. Л. Немчинская, В. М. Божков, В. И. Кушнер, *Биохимия*, т. 35, 6, 1067 (1970). <sup>12</sup> A. E. Chung, *Biochim. et biophys. acta*, v. 159, 3, 490 (1968). <sup>13</sup> B. J. Radola, *J. Chromat.*, v. 38, 1, 61 (1968). <sup>14</sup> L. Ornstein, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v. 121, 321 (1964). <sup>15</sup> G. Kopperschlager et al., *FEBS Letters*, v. 5, 3, 221 (1969).