

Академик С. Е. СЕВЕРИН, В. С. ГОМАЗКОВА, О. Э. КРАСОВСКАЯ

### ИЗУЧЕНИЕ ЧЕТВЕРТИЧНОЙ СТРУКТУРЫ $\alpha$ -КЕТОГЛУТАРАТДЕГИДРОГЕНАЗНОГО КОМПЛЕКСА ИЗ ГРУДНОЙ МЫШЦЫ ГОЛУБЯ

$\alpha$ -Кетоглутаратдегидрогеназный комплекс (КФ 1.2.4.2, КГД-комплекс), катализирующий многостадийный процесс окислительного декарбоксилирования  $\alpha$ -кетоглутаровой кислоты, представляет собой полиферментную систему с молекулярным весом около 3 000 000 (1). В состав комплекса входят три фермента, осуществляющие сопряженные реакции:  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназа\* (КГД), липоилтрансукцинилаза (ЛТС) и липоилдегидрогеназа (ЛД). КГД-комплексы из *Escherichia coli* и сердца свиньи разделены на составляющие их ферменты (2, 3). В нашей лаборатории из КГД-комплекса грудной мышцы голубя выделены в свободном состоянии КГД и ЛД, а также субкомплекс КГД — ЛТС (4).

Исследование строения КГД-комплексов из *E. coli* и тканей млекопитающих методом электронной микроскопии обнаружило их сложную интегральную структуру (1, 3). Показано, что ЛТС, имеющая форму куба, образует ядро комплекса, по периферии которого располагаются молекулы КГД и ЛД. Рентгеноструктурный анализ подтвердил октаэдральную симметрию бактериальной ЛТС, состоящей из 24 идентичных или очень близких по свойствам субъединиц (5). Электрофорезом в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН) определены молекулярные веса субъединиц ферментов, составляющих бактериальный КГД-комплекс: КГД 94 000, ЛТС 47 000—51 000, ЛД 54 000—59 000 (6, 7).

Рид и сотрудники установили (1, 7) следующее соотношение компонентов в КГД-комплексе из *E. coli*: 6 КГД (12 субъединиц), 1 ЛТС (24 субъединицы), 6 ЛД (12 субъединиц). Койке и др. (3) на основании данных по разделению и реконструкции предполагают аналогичное строение КГД-комплекса из сердца свиньи. Однако субъединичный состав ни одного из КГД-комплексов животного происхождения не известен. Настоящая работа посвящена изучению четвертичной структуры КГД-комплекса из грудной мышцы голубя.

Выделение и очистку комплекса проводили по модифицированному методу Сэпэди (4), заменив на стадии гель-фильтрации биогель Р-300 сефарозой 6 В. КГД- и ЛД-компоненты комплекса получены методами, описанными ранее (4). Молекулярные веса множественных форм КГД-компонента комплекса определяли методом электрофореза в градиенте полиакриламидного геля, как описано в (8). В качестве белков-свидетелей использовали мономер (67 000) и олигомерные формы (димер, тример, тетрамер) бычьего сывороточного альбумина.

Молекулярный вес субъединиц КГД-комплекса определяли методом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии ДСН, как описано в (9). Растворы белка обрабатывали 1% ДСН и 1%  $\beta$ -меркаптоэтанолом (МЭ) при 100° в течение 5 мин., затем диализовали или разводили до 0,1% концентрации ДСН и МЭ. Электрофорез проводили в 10% геле в те-

\* Это обозначение в настоящее время принято для компонента, осуществляющего декарбоксилирование.

чение 6 час. при силе тока 8 ма на трубку. Столбики геля в течение 1 часа фиксировали 20% сульфасалициловой кислотой, оставляли на ночь в 0,1% кумасси бриллиантово-голубом и отмывали смесью метанол — вода — уксусная кислота (4:15:1). В качестве белков-стандартов использовали фосфоорилазу b (молекулярный вес субъединицы 92 000), бычий сывороточный альбумин (67 000), глутаматдегидрогеназу (53 000), овалбумин (46 000), глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу (36 000), цитохром с

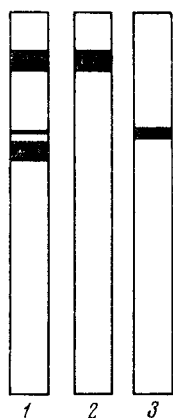


Рис. 1

Рис. 1. Схема электрофореграмм в ДСН. 1 —  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназного комплекса; 2 —  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназы; 3 — липоилдегидрогеназы



Рис. 2

Рис. 2. Электрофоретическое разделение  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназы в градиенте полиакриламидного геля. Молекулярные веса форм КГД: а — 86 300; б — 179 900; в — 264 000; з — 346 000; д — 513 000

(11 700). В выбранном диапазоне молекулярных весов была получена прямая зависимость подвижности субъединиц белков-свидетелей от логарифма их молекулярных весов.

Под действием детергента гомогенный при седиментационном анализе КГД-комплекс ( $s_{20, w} = 34 S$ ) был разделен на три вида субъединиц (рис. 1). Сопоставление ДСН-электрофореграмм КГД-комплекса и его индивидуальных компонентов КГД и ЛД позволило идентифицировать каждую из трех полипептидных цепей. Наиболее тяжелая полипептидная цепь весом 86 000 представляет собой субъединицу КГД. ЛД-компонент диссоциирует в ДСН на субъединицы с молекулярным весом 57 000; им соответствует средняя полоса на электрофореграмме комплекса. Наиболее подвижная электрофоретическая фракция с молекулярным весом 54 000 по своему количественному содержанию близка к КГД-компоненту и, по-видимому, представляет собою субъединицу ЛТС.

Длительное хранение препаратов и неоднократное их замораживание и оттаивание приводило к появлению при электрофорезе в ДСН дополнительных белковых полос, соответствующих, по-видимому, продуктам протеолитической деградации ферментов<sup>(6)</sup>. Обнаружение в предварительных исследованиях четвертичной структуры КГД нескольких фракций<sup>(10)</sup>, вероятно, объясняется использованием в этих случаях «постаревших» препаратов фермента и мягкими условиями инкубации в ДСН, что не исключало возможности протеолиза.

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что, как и в случае бактериального комплекса, каждый из ферментов КГД-комплекса грудной мышцы голубя, по-видимому, состоит из однородных субъединиц.

Седиментационные свойства обоих комплексов и их компонентов (<sup>2, 4</sup>), а также молекулярные веса их субъединиц находятся в хорошем соответствии, что позволяет предполагать большое сходство в молекулярной организации КГД-систем животного и бактериального происхождения.

Ранее нами было показано, что КГД-компонент комплекса из грудной мышцы голубя может находиться в нескольких активных формах, молекулярные веса которых определены методом гель-фильтрации (<sup>10</sup>). При электрофоретическом исследовании свободной КГД в полиакриламидном геле было выявлено несколько компонентов. В настоящей работе определены молекулярные веса электрофоретических форм КГД путем проведения экспериментов в градиенте полиакриламидного геля.

На электрофореграммах КГД (рис. 2) в основном проявлялось пять компонентов с молекулярными весами 86 300, 179 900, 264 000, 346 000 и 513 000, соотношение которых в различных препаратах фермента варьировало. Наиболее подвижный компонент в соответствии с результатами электрофореза в ДСН идентифицирован как мономерная форма фермента, а остальные, по-видимому, представляют собой димер, тример, тетрамер и гексамер. На электрофореграммах некоторых препаратов проявлялись минорные компоненты, соответствовавшие еще большей степени олигомерности. При исследовании тетразолиевым методом (<sup>10</sup>) во всех фракциях, кроме мономерной, выявлена КГД-активность.

Определенные электрофоретическим методом значения молекулярных весов активных форм КГД находятся в хорошем соответствии с результатами исследования фермента методом гель-фильтрации (<sup>10</sup>). Результаты настоящей работы в сочетании с полученными ранее позволяют заключить, что свободная КГД представляет собой равновесную систему олигомеров, построенных из идентичных или очень близких по свойствам субъединиц.

Следует отметить существенные различия в четвертичной структуре КГД и пируватдегидрогеназного компонента (ПД) пируватдегидрогеназного комплекса из грудной мышцы голубя: ПД построена из двух видов субъединиц  $\alpha$  (42 000) и  $\beta$  (37 000) (<sup>11</sup>). Такая молекулярная организация ПД обусловлена свойственным ПД-комплексам животных способом регуляции процессов фосфорилирования — дефосфорилирования ПД-компонента (<sup>12</sup>). ПД *E. coli*, для которой подобный тип регуляции не характерен, состоит из двух идентичных полипептидных цепей (<sup>6, 13</sup>).

При исследовании регуляторных свойств КГД-комплекса из грудной мышцы голубя мы не обнаружили ингибирующего влияния на фермент. По-видимому, путь регуляции КГД отличен от известного способа контроля активности ПД животного происхождения, что находит свое отражение в различиях их четвертичной структуры.

Московский государственный университет  
им. М. В. Ломоносова

Поступило  
19 VI 1974

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> L. J. Reed, R. M. Oliver, Brookhaven Symp. Biol., v. 21, 397 (1968). <sup>2</sup> B. B. Mukherjee, J. Matthews et al., J. Biol. Chem., v. 240, PC 2268 (1965). <sup>3</sup> N. Tanaka, K. Koike et al., J. Biol. Chem., v. 247, 4043 (1972). <sup>4</sup> С. Е. Северин, В. С. Гомазкова, Биохимия, т. 36, 1099 (1971). <sup>5</sup> D. J. Derosier, R. M. Oliver, L. J. Reed, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 68, 6, 1135 (1971). <sup>6</sup> R. N. Perham, J. O. Tomas, FEBS Letters, v. 15, 8 (1971). <sup>7</sup> F. H. Pettit, L. Hamilton et al., J. Biol. Chem., v. 248, 5282 (1973). <sup>8</sup> G. Kopperschlager, W. Diezel et al., FEBS Letters, v. 5, 221 (1969). <sup>9</sup> K. Weber, M. Osborn, J. Biol. Chem., v. 244, 4406 (1969). <sup>10</sup> В. С. Гомазкова, С. Е. Северин, Биохимия, т. 37, 637 (1972). <sup>11</sup> Л. С. Хайлова, М. М. Фейгина и др., Биохимия, т. 37, 1312 (1972). <sup>12</sup> T. C. Linn, F. H. Pettit et al., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 64, 229 (1969). <sup>13</sup> C. R. Barrera, G. Namihira et al., Arch. Biochem. and Biophys., v. 148, 343 (1972).