



УДК 577.15.02

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МЕЖДУ *D*-ГЛИЦЕРАЛЬДЕГИД-3-ФОСФАТ-ДЕГИДРОГЕНАЗОЙ И АДЕНОЗИНТРИФОСФАТОМ *

Кравчинский Г. В., Маркович Д. С.

Институт биологической физики Академии наук СССР, Пущино

Установлено, что апофермент *D*-глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы быстро и некооперативно связывает не более двух молекул АТР с $K_d = 2-4 \cdot 10^{-5}$ М. Одновременное связывание NAD и АТР на субъединице невозможно, и общее число молекул NAD и АТР на тетрамере не превышает четырех. АТР индуцирует в молекуле фермента структурные перестройки с временами релаксации от 0,7 до 10 мин. Индуцированные АТР изменения обратимы и преобладают диссоциации фермента. Они наблюдаются в широком диапазоне концентраций фермента (0,05—3 мг/мл) и температур (0—25°) и не зависят существенно от этих параметров. АТР вызывает медленное ингибирование реакции окисления глицеральдегид-3-Р (но не глицеральдегида). Степень медленного ингибирования сильно зависит от концентрации фермента, связана с диссоциацией, оба процесса происходят после обратимых перестроек в структуре тетрамера.

Известно, что внутриклеточная концентрация нуклеотидов является фактором, регулирующим интенсивность гликолиза в основном посредством изменений активности фосфофруктокиназы [1]. Несомненно, однако, что при некоторых режимах работы этой полиферментной системы может оказаться эффективной регуляция и в других ее участках [2]. Поэтому обнаружение эффективного ингибирования ГАФД аденозинтрифосфатом [3, 4] вызвало большой интерес. В отличие от первых работ Дила и соавт. [4], в исследованиях Парк [3, 5] было показано, что АТР ингибирует активность фермента при значениях рН, температурах, концентрациях нуклеотидов и фосфата, близких к физиологическим. Во внутриклеточных условиях ГАФД, по-видимому, проявляет не более 10% от максимальной активности и поэтому регуляция действия фермента может иметь значение для регуляции гликолиза в целом [5, 6]. Несмотря на большое количество исследований, основные вопросы, касающиеся механизма регуляции ГАФД нуклеотидами, остаются неясными. Продолжительная инкубация с АТР (4—20 ч) ведет к медленной инаktivации и диссоциации фермента [4].

В предыдущих работах нами было показано [7, 8], что АТР вызывает локальные перестройки в активном центре, а также медленные изменения

* Сокращения: ГАФД — *D*-глицеральдегид-3-фосфат: NAD⁺-оксидоредуктаза (фосфорилирующая) (КФ 1.2.1.12), ФМА — флуоресцеинмеркурацетат, ФИТЦ — флуоресцеиназотиоцианат, DNS-Cl — диметиламинонафталинсульфонилхлорид, ФГА — глицеральдегид-3-Р, ГА — глицеральдегид, SH¹⁴⁹ и SH¹⁵³—SH-группы остатков Cys¹⁴⁹ и Cys¹⁵³ соответственно.

третичной и четвертичной структуры фермента, предположительно переориентацию субъединиц в тетрамере. По вопросу о природе центров связывания АТР единого мнения нет. Недавно Келети и соавт. [9] предположили, основываясь на кинетических данных по влиянию АТР на ингибирование ГАФД коферментом, существование аллостерических центров.

Настоящая работа посвящена исследованию центров связывания АТР на ферменте. В ней приведены новые экспериментальные доказательства наличия «медленных» конформационных переходов фермента и обсуждается вопрос об их связи с инактивацией и диссоциацией фермента.

Таблица 1

Равновесное связывание АТР с ГАФД

Число связанных молей NAD на моль ГАФД	Число связанных молей АТР на моль ГАФД (ошибка $\pm 10\%$)
3,5	0,3
3,1	0,9
2,5	1,3
1,8	2,3
0,7	2,1
0,3	2,3

Связывание АТР с ГАФД. При исследовании равновесного связывания АТР (см. «Экспериментальную часть») в интервале рН 7,2—8,0 было показано, что при концентрации АТР, равной 1 мМ, холофермент, содержащий 3,0—3,5 моль NAD на моль ГАФД, связывает не более 0,5—0,7 моль АТР. По мере удаления NAD количество связывающихся молекул АТР увеличивается, достигая 2 моль на моль апофермента (табл. 1). Как видно из данных таблицы, число связывающихся молекул АТР не пре-

вышает числа свободных от NAD активных центров. Если понизить средство NAD к активному центру путем модификации SH¹⁴⁹ [10], то АТР эффективно конкурирует с NAD (рис. 1) и связывается в количестве 2 моль на моль тетрамера ГАФД. При этом 2 моль NAD вытесняются из активных центров. Из кинетических исследований также известно, что

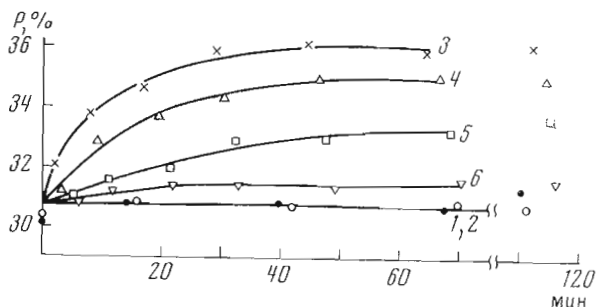


Рис. 1. Влияние NAD на кинетику индуцируемых АТР структурных изменений по данным поляризации флуоресценции P комплекса апо-ГАФД — ФМА. Все SH¹⁴⁹ апофермента карбоксиметилированы, ФМА связан с SH¹⁵³, [ФМА]/[ГАФД] = 1: 1 — ГАФД (10^{-5} M) без NAD и АТР, 2 — то же в присутствии 1 мМ NAD, 3 — то же в присутствии 1 мМ АТР, 4—6 — то же в присутствии 1 мМ АТР и $2 \cdot 10^{-5}$ M, 10^{-4} M и 10^{-3} M NAD соответственно (0,1 M трис-НСl буфер, рН 8,0, 12°)

ингибирование АТР является конкурентным по отношению к NAD [5]. Таким образом, из экспериментов следует, что одновременное связывание АТР и NAD на одной субъединице невозможно.

Используя изменения интенсивности I и анизотропии A флуоресценции метки в активном центре ГАФД в качестве параметров, отражающих связывание АТР [8], мы определили константу диссоциации согласно уравнению Скатчарда:

$$C(n - V) = K_d V,$$

где C — концентрация свободного АТР, V — доля занятых центров связывания АТР, n — кажущееся число центров связывания. Значения V рассчитывали из соотношений:

$$V_I = \frac{I_C - I_0}{I_\infty - I_0}; \quad V_A = \frac{A_C - A_0}{\psi(A_\infty - A_C) + (A_C - A_0)},$$

где I_0 и A_0 , I_C и A_C , I_∞ и A_∞ — значения интенсивности и анизотропии флуоресценции при нулевой, промежуточной и насыщающей концентрациях АТР соответственно, ψ — отношение интенсивностей флуоресценции без АТР и при насыщающих концентрациях АТР.

Как видно из рис. 2, график Скатчарда для апо-ГАФД с четырьмя мечеными активными центрами липеин. Это говорит о независимом связывании двух молекул АТР на апоферменте.

Величина константы диссоциации, полученная из кривой титрования по данным анизотропии мало отличается от значения константы, полученной из данных об изменении интенсивности флуоресценции. Константа равна $2-4 \cdot 10^{-5}$ М и совпадает с константой, полученной из кривых титрования апофермента, меченного

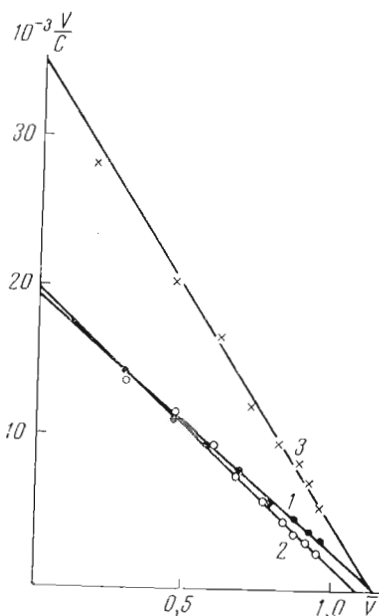


Рис. 2

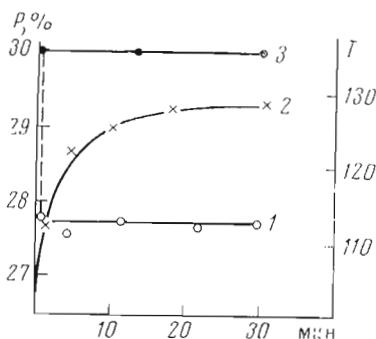


Рис. 3

Рис. 2. Графики Скатчарда титрования АТР комплексов апо-ГАФД — ФМА. ГАФД инкубировали с различными концентрациями АТР и регистрировали значения P (3) или I (1, 2) при выходе кинетики на плато: 1 — 4 и 2 — 1 моль ФМА на моль ГАФД связан с SH^{140} ; 3 — все SH^{140} карбоксиметилированы, 1 моль ФМА на моль ГАФД связан с SH^{153} [ГАФД] = $5 \cdot 10^{-6}$ М (0,1 М трис-НСI), рН 8,0, 42°

Рис. 3. Кинетика индуцируемых АТР изменений по данным поляризации P (1) и интенсивности I (2) флуоресценции комплекса апо-ГАФД — ФИТЦ, 3 — контроль P без АТР. [ГАФД] = $1,5 \cdot 10^{-5}$ М, [АТР] = 1 мМ (0,1 М трис-НСI буфер, рН 7,4—8,0, 42°)

по одному центру (рис. 2). Нетрудно показать, что величина константы диссоциации не зависит от степени модификации и кривая титрования частично меченного фермента линейризуется в координатах Скатчарда только в том случае, если АТР имеет близкое сродство к модифицированным (меченым) и немодифицированным центрам.

Как было показано нами ранее [8], кинетика индуцируемых АТР изменений интенсивности флуоресценции и КД комплексов апо-ГАФД с ФМА имеет быструю стадию (менее 20 с). Новые доказательства быстрого связывания АТР получены при исследовании апо-ГАФД, меченой ФИТЦ (рис. 3). Поскольку NAD тушит флуоресценцию метки в активном центре ГАФД (см. далее рис. 7, б), то АТР, вытесняя

NAD, вызывает быстрое увеличение интенсивности флуоресценции, менее чем за 20—30 с, что также свидетельствует о быстром связывании АТР.

Кинетика конформационных перестроек индуцируемых АТР. «Медленные» изменения, индуцированные АТР, были обнаружены в комплексе апо-ГАФД — ФМА, в котором одна из двух SH-групп активного центра (SH¹⁴⁹ или SH¹⁵³) реагировала с меткой [8]. Модификация в этом важном для функции фермента участке могла повлиять на кинетику конформационных перестроек, поэтому мы исследовали их при помощи ФИТЦ, а также по данным собственных флуоресцентных характеристик апо-ГАФД.

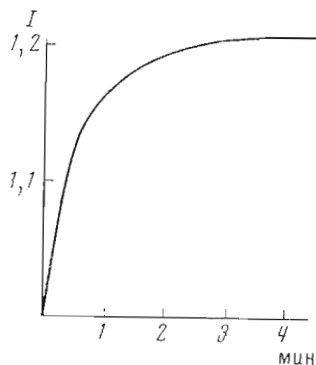


Рис. 4. Кинетика индуцируемого АТР возрастания интенсивности собственной флуоресценции апо-ГАФД. [ГАФД] = 10^{-5} М, [АТР] = 1 мМ (0,1 М трис-НСl буфер, рН 7,4, 18°). Флуоресценцию возбуждали при 296,7 нм и регистрировали при 335 нм

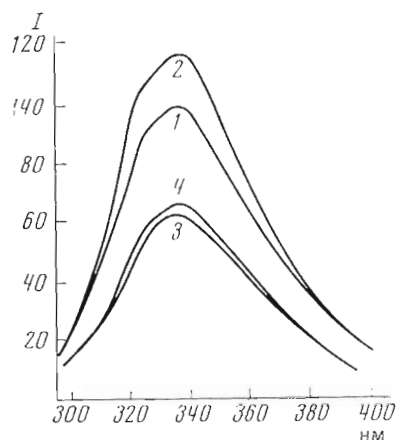


Рис. 5. Спектры флуоресценции: 1 — апо-ГАФД, 2 — апо-ГАФД после 15 мин инкубации с 1 мМ АТР, 3 — апо-ГАФД + 0,1 мМ NAD, 4 — апо-ГАФД, пренкубированная с 1 мМ АТР + 0,1 мМ NAD. [ГАФД] = 10^{-5} М (0,1 М трис-НСl буфер; рН 7,4, 18°). Флуоресценцию возбуждали при 296,7 нм

Хотя точная локализация ФИТЦ на макромолекуле не исследовалась, можно утверждать, что метка не связана с SH-группами, поскольку, во-первых, реакция проводилась при рН 7,4 в присутствии 5 мМ β-меркаптоэтанола, во-вторых, предварительное карбоксиметилирование (йодацетатом) четырех групп SH¹⁴⁹, имеющих повышенную реакционную способность, не влияет на количество связывающихся молекул ФИТЦ. Как видно из рис. 3, АТР вызывает медленное увеличение интенсивности и быстрое уменьшение поляризации флуоресценции Р метки. Как показано ранее [8], медленные изменения Р в комплексе апо-ГАФД—ФМА были обусловлены уменьшением эффективности миграции энергии между метками на разных субъединицах тетрамера. В данном случае молярное соотношение ФИТЦ/ГАФД было меньше единицы, т. е. условия для эффективной миграции энергии между метками отсутствовали. Быстрое уменьшение поляризации (кривая 1, рис. 3) вызвано, скорее всего, изменениями локальной подвижности метки. Кинетика изменений интенсивности длится 10—15 мин (кривая 2, рис. 3) после связывания АТР, что говорит о независимости «медленных» перестроек от характера модификации фермента. Наконец, обнаружение медленных изменений собственной флуоресценции апо-ГАФД после связывания АТР убеждает в том, что «медленность» перестроек не является следствием химической модификации фермента (рис. 4). Как показал анализ спектров флуоресценции апо-ГАФД, вклад во флуоресценцию внутренних («неполярных») триптофанов и внешних, но не экспонированных в воду [11], составляет соответственно 60 и 40%.

Как видно из рис. 5, при взаимодействии с АТР происходит сдвиг на 1—2 нм в длинноволновую сторону и уширение спектра флуоресценции. Увеличение квантового выхода q происходит в основном за счет длинноволновой части спектра. Эти данные говорят об изменениях в окружении триптофанов, причем, судя по увеличению q , изменения вряд ли связаны с непосредственным взаимодействием триптофанов и АТР.

Используемые выше методы не дают возможности представить себе масштабы изменений в целом. Судя, однако, по высоким значениям P , изменений типа денатурационных не наблюдается. Непосредственно об этом свидетельствуют полученные нами данные спектрополяриметрии.

Таблица 2

Времена полупревращений $t_{1/2}$ для переходов, индуцируемых АТР в ГАФД, регистрируемых по различным параметрам

Исследуемый параметр	$t_{1/2}$, мин
Флуоресценция триптофановых остатков апофермента	0,49
Флуоресценция ФИТЦ в апо-ГАФД — ФИТЦ	1,9
КД ФМА в апо-ГАФД — ФМА (метка на SH ¹⁴⁹)	4,7
Флуоресценция ФМА в апо-ГАФД — ФМА (метка на SH ¹⁵³)	6,9
Активность апо-ГАФД	19,0
Поляризация флуоресценции DNS в апо-ГАФД — DNS	40,0

Значение коэффициента — b_0 в уравнении Моффитта, отражающее содержание α -спиральной структуры, не изменяется после продолжительной инкубации апофермента с АТР. Предварительная инкубация с АТР не влияет на характер структурных перестроек, сопровождающих связывание NAD.

Кинетика перестроек, регистрируемая по изменениям спектральных параметров флуоресцентных меток и по изменениям собственной флуоресценции апофермента, описывается уравнением кинетики первого порядка; значения констант скорости не зависят от концентрации фермента. Времена переходов, определенные по изменениям разных параметров, заметно различаются (табл. 2). Эти различия объясняются, видимо, тем, что регистрируемые параметры дают информацию о различных процессах в различных участках молекулы.

«Медленность» индуцируемых АТР перестроек может объясняться тем, что обработка активированным углем нарушает нативную конформацию апофермента, а АТР вызывает медленный переход (типа ренатурации) в нативное состояние. Для того чтобы исключить такую возможность, мы получали апофермент, понижая сродство к NAD путем модификации SH¹⁴⁹ при помощи ФМА и отделяя кофермент гель-фильтрацией. Спектральные характеристики этого комплекса и кинетика индуцируемых АТР изменений совпадают с вышеприведенными. Более того, медленные изменения проявляются и в холоферменте, если сродство к NAD понизить карбоксиметилированием SH¹⁴⁹, т. е. в условиях, когда АТР эффективно конкурирует с коферментом (рис. 1). В последнем случае ацетильный остаток является аналогом субстрата в промежуточном фермент — субстратном комплексе.

Способность вызывать медленные перестройки в молекуле ГАФД не является уникальным свойством АТР. Кофермент NAD вызывает столь же медленные изменения спектральных параметров комплексов апо-ГАФД с ФМА и ФИТЦ. Подробно эти результаты будут изложены в последующих публикациях.

Рядом исследований было показано [4, 12], что инкубация апофермента с АТР в течение 4—8 ч приводит к диссоциации на димеры или мономеры в зависимости от концентрации фермента.

Возникает вопрос, является ли диссоциация причиной наблюдаемых нами перестроек или они предшествуют диссоциации. Для решения этого вопроса мы использовали DNS-Cl, метку со сравнительно большим временем жизни возбужденного состояния (τ 16,5 нс), что позволяет исследовать изменения времен вращательной релаксации ρ , обусловленные диссоциацией олигомерных белков [13, 14]. Исследование облегчается тем, что DNS-группа, ковалентно связываясь с ГАФД, довольно жестко фиксируется на макромолекуле, о чем говорят высокие значения P . При значениях τ 16,5 нс и P_0 0,424 изменение ρ от 220 нс (M 140 000) до 80 нс (мономер, M 35 000) должно приводить к уменьшению P от 0,356 до 0,28 (комнатная температура, водные растворы). При диссоциации на димеры (ρ 150 нс) изменение составляет не более 0,02—0,03. На рис. 6 приведена зависимость P комплекса апо-ГАФД — DNS от времени инкубации с АТФ.

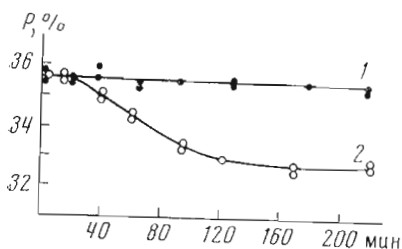


Рис. 6. Зависимость поляризации флуоресценции комплекса апо-ГАФД — DNS от времени инкубации с АТФ. $[DNS]/[ГАФД] = 0,5$. $[ГАФД] = 3,1 \cdot 10^{-5}$ М. 1 — контроль без АТФ, 2 — 1 мМ АТФ (0,1 М трис-НСl, рН 7,4, 12°). Флуоресценцию возбуждали при 365 нм и регистрировали при 530 нм

Видно, что поляризация не изменяется заметным образом в течение первых 20 мин инкубации; далее значения P уменьшаются и через 2 ч кривая выходит на плато. Следовательно, первые 20—30 мин заметной диссоциации не происходит. Конечная величина P совпадает со значением, вычисленным для димера; это согласуется с сообщением Константинидиса и соавт. [4] о диссоциации на димеры при данной концентрации фермента. Однако для однозначной интерпретации изменений поляризации необходимы измерения τ в присутствии АТФ.

Второй подход, который мы использовали для исследования диссоциации, основан на явлении рекомбинации модифицированных и нативных мономеров с образованием гибридных форм [15]. Этим методом также не обнаружено заметной диссоциации фермента в течение 30 мин инкубации с АТФ. Очевидно, что

обнаруженные нами конформационные перестройки предшествуют диссоциации.

Исследование обратимости конформационных переходов. Если после 30-минутной инкубации с апоферментом удалить АТФ гель-фильтрацией, то можно видеть, что изменения поляризации и интенсивности флуоресценции меток, а также квантового выхода собственной флуоресценции ГАФД полностью обратимы. Повторные добавления АТФ вызывает такое же увеличение поляризации, что и первая инкубация, но иные изменения интенсивности флуоресценции метки. Как доказывалось ранее [7, 8], изменения I обусловлены в основном локальными перестройками, поэтому можно думать, что они в известной степени необратимы. Об этом же свидетельствует исследование индуцированного эффекта Коттона в полосе поглощения метки. Вызванное нуклеотидом уменьшение дихроичности имеет частично необратимый характер. Как было показано нами ранее, АТФ вызывает изменения локального окружения и реактивности SH-групп активного центра, что в определенных условиях индуцирует реакцию внутримолекулярного отщепления метки от SH¹⁴⁹. Не исключено, что частичная необратимость обусловлена присутствием метки. В другой серии экспериментов мы исследовали обратимость, используя конкуренцию NAD и АТФ. Показано, что степень обратимости по данным флуоресценции фермента зависит от концентрации NAD; кофермент в концентрации 0,1 мМ на 70% уменьшает влияние АТФ (рис. 5). По данным Огучи и соавт. [5], при этих условиях АТФ ингибирует ГАФД на 30%, т. е. насыщает ~30% центров, связывающих нуклеотид. Следовательно, по дан-

ным флуоресценции белка, изменения, вызванные АТР, обратимы.

На рис. 7, а видно, что NAD не вызывает изменений *P* комплекса апо-ГАФД — ФМА, но тушит флуоресценцию метки. Добавление NAD после предынкубации с АТР вызывает полное обращение действия АТР по данным поляризации (рис. 7, а, кривая 1) и не обращает значений *I* (рис. 7, б, кривая 1). Таким образом, вытеснение АТР коферментом приводит к тем же результатам, что и удаление гель-фильтрацией: обратимость изменений полная — по «обобщенным» параметрам, характеризующим третичную и четвертичную структуру (флуоресценция триптофанов и миграция энергии между метками), и неполная — по параметрам, характеризующим локальное окружение метки. Приведенные результаты не дают возможности оценить, как быстро после удаления АТР происходит восстановление исходной структуры: гель-фильтрация — длительная процедура, а быстрое обращение параметров после добавления NAD может объясняться влиянием кофермента.

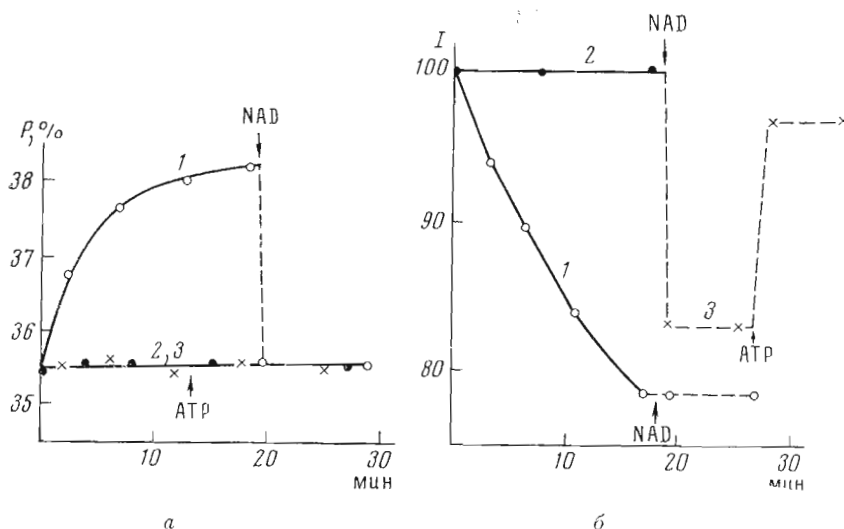


Рис. 7. Обратимость действия АТР при вытеснении коферментом NAD по данным поляризации (а) и интенсивности (б) флуоресценции ФМА: 1 — комплекс апо-ГАФД — ФМА (1 моль ФМА/моль ГАФД) инкубировали с 1 мМ АТР и через 18 мин добавляли 1 мМ NAD; 2 — контроль без АТР, 3 — комплекс инкубировали с 1 мМ NAD и затем добавляли 1 мМ АТР $[ГАФД] = 10^{-5}$ М (0,1 М трис-НСl, рН 8,0, 12°)

Влияние АТР на активность ГАФД. Как видно из рис. 8, инкубация апо-ГАФД с АТФ ведет к медленному ингибированию реакции окисления фосфоглицеринового альдегида. Это ингибирование (или инактивация) отличается от обычного, «быстрого», конкурентного или неконкурентного ингибирования, так как измерения активности проводились без добавления АТР в реакционную среду. Такая инактивация либо необратима, либо реактивация происходит очень медленно. Тот факт, что активность фермента достигает постоянных значений, свидетельствует в пользу обратимости «медленной» инактивации. Для того чтобы оценить скорость реактивации, фермент в различных концентрациях инкубировали с 6 мМ АТР, а затем быстро разбавляли буфером или раствором 6 мМ АТР в буфере до концентрации фермента 0,05 мг/мл, а далее определяли активность фермента обычным способом. Мы получили совпадающие значения активности независимо от того, добавлялся или нет АТР при разбавлении. Отсюда ясно, что удаление АТР разбавлением не ведет к быстрой активизации, что и следовало ожидать. При определении активности ГАФД в разбав-

ленном растворе путем отбора проб через определенные промежутки времени удалось наблюдать очень медленную реактивацию, которая продолжалась ~ 1 ч. За это время восстанавливается $\sim 20\%$ активности; нестабильность фермента при низких концентрациях (активность в контроле быстро падает) препятствовала дальнейшим измерениям.

Если сравнить время, в течение которого происходит инактивация и реактивация фермента со временами конформационных перестроек (табл. 2), то можно видеть, что изменения активности сопоставимы по длительности только с предполагаемой диссоциацией. О связи этих процессов свидетельствует и тот факт, что степень «медленного» ингибирования уменьшается с увеличением концентрации фермента в инкубационной среде, и при концентрации фермента 10 мг/мл ингибирование не обнаруживается (рис. 8 и 9).

Если в качестве субстрата используется ГА, то «медленное» ингибирование отсутствует. Заметное на рис. 8 ингибирование этой реакции

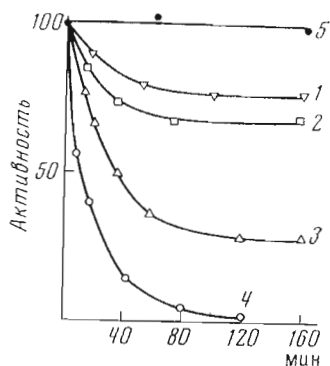


Рис. 8

Рис. 8. Кинетика ингибирования апо-ГАФД при длительной инкубации с АТР. ГАФД инкубировали с 6 мМ АТР в 0,1 М трис-НСI буфере (рН 7,4) при 0° в концентрации, мг/мл: 1 — 5; 2 — 1,3; 3 — 0,3 и 4 — 0,05; 5 — активность апо-ГАФД при инкубации без АТР. Через некоторые интервалы времени из инкубационной смеси отбирали 0,1 мл раствора фермента, развели буфером до концентрации фермента 0,05 мг/мл и активность определяли, добавляя 0,02 мл этого раствора к 2 мл реакционной смеси, включающей $[NAD] = 0,6$ мМ; $[FGA] = 0,2$ мМ; $[P_i] = 1,66$ мМ при 25°

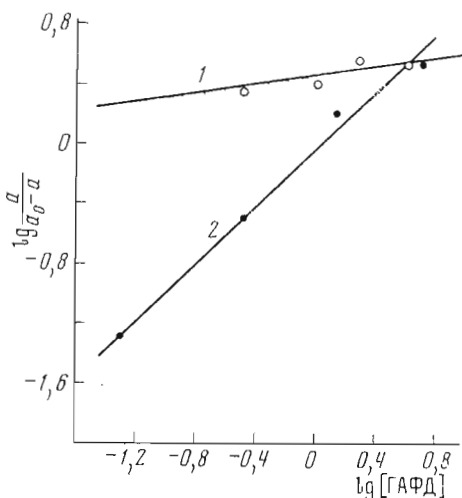


Рис. 9

Рис. 9. Зависимость степени «медленного» ингибирования реакции окисления фосфоглицеринового (2) и глицеринового (1) альдегида от логарифма концентрации фермента в инкубационной смеси: a — активность апофермента после 2 ч инкубации с АТР, a_0 — то же после 2 ч инкубации без АТР. (Условия инкубации с АТР и определения активности с глицеральдегид-3-Р см. подпись к рис. 8). Для определения ингибирования реакции окисления глицеринового альдегида из инкубационной смеси отбирали 0,5 мл раствора ГАФД соответствующей концентрации и добавляли к 1,5 мл реакционной среды, включающей $[NAD] = 0,2$ мМ $[GA] = 20$ мМ, $[P_i] = 1$ мМ (0,1 трис-НСI буфер, рН 7,4, при 25°). Контролем служила активность апо-ГАФД соответствующей концентрации без АТР. АТР в реакционной среде (1,5 мМ) ингибирует активность на 25—30%. Концентрация фермента выражена в мг/мл

целиком объясняется присутствием значительных количеств АТР в реакционной смеси из-за недостаточного разбавления фермента в условиях реакции окисления ГА. Отсюда следует, что перестройки, ведущие к медленной инактивации, затрагивают преимущественно тот участок активного центра, который взаимодействует с фосфатной группой субстрата.

Ранее Овади и соавт. [2] было показано, что 2 молекулы АТР не отде-

ляются от апофермента ГАФД при гель-фильтрации. Как показали наши эксперименты по равновесному связыванию, даже при концентрации АТР, значительно превышающей константу диссоциации, связывается не более 2 моль АТР на моль тетрамера. Такая сильная отрицательная кооперативность, при которой только половина центров связывает субстраты или химические реагенты, в последние годы обнаружена для нескольких ферментов [16, 17]. Как следует из результатов рентгеноструктурного анализа ГАФД [18], молекула фермента состоит из двух эквивалентных димеров. Интересной особенностью структуры является попарная сближенность активных центров в олигомере. При этом пирофосфатная группа молекулы NAD, связанной в активном центре одной субъединицы, взаимодействует с остатком лизина-183 в активном центре соседней субъединицы. Это взаимодействие, возможно, является причиной отрицательной кооперативности в связывании NAD [18]. АТР является аналогом NAD, поэтому весьма вероятно, что отрицательная кооперативность так же, как и для NAD, объясняется влиянием пирофосфатной группировки и усиливается наличием третьего фосфата.

Если с 1 моль холофермента связано ~ 4 моль NAD, то даже при концентрации АТР 1—2 мМ связывается менее 1 моль нуклеотида на моль ГАФД (табл. 1). Связывание такого количества АТР легко можно объяснить конкуренцией с NAD за четвертый активный центр [10]. Полученные результаты не дают оснований предполагать наличие какого-либо дополнительного центра связывания АТР. Такое предположение было высказано ранее Овади и соавт. [9] для объяснения влияния АТР на субстратное ингибирование ГАФД. Однако как сам факт субстратного ингибирования, так и влияние на него АТР можно объяснить, не прибегая к предположению о наличии регуляторного центра [19].

Хотя тетрамер ГАФД связывает не более двух молекул АТР, одновременное связывание двух молекул NAD и двух молекул АТР на молекуле ГАФД возможно (табл. 1). При этом степень конкурентного ингибирования близка к 100% [5]. Этот факт подтверждает гипотезу Слейтера и соавт. [10] о том, что в молекуле ГАФД «работают» только те центры, которые наименее прочно связывают NAD.

Как показали результаты наших исследований, индуцируемые АТР медленные перестройки в структуре фермента являются обратимыми. Частичная необратимость изменений наблюдается лишь по тем параметрам, которые характеризуют локальное окружение метки, и вызвана, видимо, присутствием последней. Скорость регистрируемых переходов не зависит от значений pH в интервале 7—8, концентрации фермента и АТР и не меняется заметным образом в диапазоне температур 0—25°. Следовательно, индуцируемые АТР перестройки являются внутримолекулярной изомеризацией. При низкой концентрации фермента они ведут к медленной диссоциации и инактивации. Последние процессы, однако, не могут играть заметной роли *in vivo*, поскольку при высоких внутриклеточных концентрациях ГАФД [20] степень «медленного» ингибирования должна быть ничтожна.

В предыдущей работе [8] мы предположили, что одним из последствий связывания АТР молекулой ГАФД является перестройка четвертичной структуры фермента, изменение взаимной ориентации субъединиц, а следовательно, и характера их взаимодействий. Это может привести к изменению кооперативных свойств олигомера, играющих большую роль в регуляции активности [21]. Некоторые данные, подтверждающие возможность такой регуляции в ГАФД, можно найти в работах Сапаг-Хагара [22] и Овади и соавт. [9]. При подробном кинетическом анализе ингибирования ГАФД АТР Огучи и соавт. [5] не обнаружили появления нелинейных кинетических характеристик. Однако эти эксперименты проводились без предынкубации фермента с АТР, в то время как индуцируемые АТР перестройки происходят в течение длительного времени.

При изменении взаимного расположения субъединиц в олигомерном ферменте изменяются не только внутренние, но и внешние контакты, если таковые существуют. До недавнего времени ферменты гликолиза считались беспорядочно распределенными в цитоплазме. Однако в последнее время появились работы, указывающие на возможность существования полиферментных комплексов в системе гликолиза [23, 24] и на возможность структурной организации ферментов гликолиза на поверхности мембран [25]. Поэтому эффекторы, вызывающие перестройки четвертичной структуры отдельных ферментов, ведущие к изменению их межмолекулярных контактов, могут регулировать структуру и функцию надмолекулярных систем.

Экспериментальная часть

ГАФД из скелетных мышц свиньи выделяли по методу Элоди и Сорени [26], модифицированному следующим образом: после первой кристаллизации раствор фермента (5—6 г в 300 мл) тщательно диализовали 30 ч против 1 мМ фосфатного буфера (рН 7,8), содержащего 1 мМ ЭДТА и 1 мМ β -меркаптоэтанола, и хроматографировали на колонке с ДЕАЕ-целлюлозой (4 × 10 см), уравновешенной тем же буфером. При этих условиях удаляется основная часть примесей, состоящих из гемсодержащих белков. Далее кристаллизовали ГАФД в обычных условиях [26]. Полученный фермент гомогенен при диск-электрофорезе, и его активность совпадает с активностью ГАФД, полученной обычным методом.

Апофермент получали, обрабатывая ГАФД активированным углем Norit А нейтральный («Серва», ФРГ). Для апофермента отношение оптических плотностей при 260 и 280 нм равно 1,9—1,95. Количество связанного кофермента определяли по поглощению на 360 нм, используя значения молярных коэффициентов экстинкции, приведенные в работе [10]. Активность фермента по отношению к фосфоглицериновому и глицериновому альдегидам определяли, регистрируя скорость восстановления NAD в течение 40с после запуска реакции по флуоресценции образующегося NADH. Длина волны возбуждающего света — 365 нм, флуоресценцию регистрировали при 460 нм.

Комплексы апо-ГАФД с ФМА получали, как описано ранее [7, 28]. Для получения комплексов ГАФД с ФИТЦ холофермент (20—30 мг/мл) инкубировали 30—60 мин с десятикратным молярным избытком ФИТЦ в 0,1 М трис-НСl буфере (рН 7,4) при 20° и в присутствии 5 мМ β -меркаптоэтанола. Комплекс отделяли от непрореагировавшей метки гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-50 («Superfine») и обрабатывали активированным углем для отщепления кофермента и удаления остатков сорбированного красителя. Количество связанной метки определяли, используя молярный коэффициент поглощения [27] $6,3 \cdot 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$. В этих условиях связывается менее одного моля ФИТЦ на моль ГАФД.

Комплексы ГАФД с DNS получали, инкубируя 6 мг DNS-Cl в 0,1 мл изопропанола с 4—5 мл холо-ГАФД ($2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$) в 0,1 М трис-НСl буфере (рН 7,4) при 0°. Через 10—15 мин раствор центрифугировали и отделяли комплекс от непрореагировавшей метки гель-фильтрацией. Комплекс содержит 0,3—0,5 моль DNS на моль ГАФД. Группы, взаимодействующие с DNS и ФИТЦ, не идентифицировали.

Равновесное связывание АТФ с ГАФД исследовали методом гель-фильтрации [21] на колонке (0,7 × 19 см) с сефадексом G-50 («Superfine») при температуре 10°. Сефадексы уравновешивали 0,1 М трис-НСl буфером (рН 8,0 или 7,2), содержащим 0,1 М NaCl и 1 мМ АТР. Перед нанесением на колонку фермент тщательно уравновешивали диализом против буфера и затем инкубировали 20—30 мин с 1 мМ АТР. На колонку наносили 0,5 мл 0,1—0,2 мМ раствора апофермента или холофермента ГАФД с различным содержанием NAD. Количество связанного АТР определяли по оптической

плотности при 260 нм, используя молярный коэффициент поглощения $15,4 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$. (Большая подвижность АТР по сравнению с NAD дает возможность определить одновременно количество связывающегося АТР и вытесненного NAD по площадям «впадины» и «пика» оптической плотности соответственно.) ФМА синтезировали и очищали по методу, описанному ранее [28]. ФИТИЦ (изомер 1) получили из Всесоюзного научно-исследовательского института химических реактивов и особо чистых химических веществ. DNS-Cl фирмы «Schuchardt» (ФРГ). Фосфоглицериновый альдегид готовили по методу Шевчука и соавт. [29]. Глицериновый альдегид, NAD, АТР, ДЕАЕ-целлюлоза фирмы «Reanal» (Венгрия).

Спектры, кинетику и поляризацию флуоресценции регистрировали на установках, описанных ранее [28]. Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре «Spectrum» (ГДР). Спектры и кинетику КД и ДОВ регистрировали на спектрополяриметре «Jasco-20» (Япония).

Авторы выражают благодарность М. Н. Ивковой и Э. А. Бурштейну (Институт биофизики АН СССР) за обсуждение данных белковой флуоресценции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kemp R. G., Krebs E. G. (1967) *Biochemistry*, 6, 423—427.
2. Williamson J. R. (1965) *J. Biol. Chem.*, 240, 2308—2311.
3. Francis S. H., Meriwether B. P., Park J. H. (1971) *J. Biol. Chem.*, 246, 5433—5441.
4. Constantinides S. M., Deal W. C. (1969) *J. Biol. Chem.*, 244, 5695—5702.
5. Oguchi M., Meriwether B. P., Park J. H. (1973) *J. Biol. Chem.*, 248, 5562—5570.
6. Наградова Н. К., Иванов М. В., Муруец В. И. (1974). Тезисы симпозиальных докладов III Всесоюзного Биохимического съезда, стр. 204, Рига.
7. Маркович Д. С., Крапивинский Г. Б., Незпайко Н. Ф. (1974) *Молекулярн. биология*, 8, 475—483.
8. Маркович Д. С., Крапивинский Г. Б. (1974) *Молекулярн. биология*, 8, 857—863.
9. Ovadi J., Nuridsany M., Keleti T. (1972) *Acta biochim. et biophys. Acad. sci. hung.*, 7, 133—141.
10. Boers W., Slater E. C. (1973) *Biochim. et biophys. acta*, 315, 272—284.
11. Burstein E. A., Vedenkina N. S., Ivkova M. N. (1973) *Photochem. Photobiol.*, 18, 263—279.
12. Ovadi J., Telegdi M., Batke J., Keleti T. (1971) *Europ. J. Biochem.*, 22, 430—436.
13. Anderson S., Weber G. (1966) *Arch. Biochem. Biophys.*, 116, 207—222.
14. Anderson S. (1969) *Biochemistry*, 8, 1394—1396.
15. Osborne H. H. (1974) *Biochem. J.*, 143, 651—656.
16. Stallcup W. B., Koshland D. E. (1973) *J. Mol. Biol.*, 80, 41—62.
17. Long C. W., Lewitzki A., Koshland D. E. (1970) *J. Biol. Chem.*, 245, 80—86.
18. Buehner M., Ford G., Moras D., Olsen K. W., Rossmann M. G. (1973) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 70, 3052—3054.
19. Гольдштейн Б. Н., Лившиц М., Волькенштейн М. В. (1974) *Молекулярн. биология*, 8, 575—578.
20. Klingenberg M., Bucher T. (1960) *Annual. Rev. Biochem.*, 29, 669—673.
21. Janin J. (1973) *Progr. Biophys. Mol. Biol.*, 27, 79—112.
22. Sapag-Hagar M. (1969) *Rev. esp. fisiol.*, 25, 201—205.
23. Hubsher G., Mayer R. J., Hansen H. J. M. (1971) *J. Bioenerg.*, 2, 115—119.
24. Földi J., Szabolcsi G., Friedrich P. (1973) *Acta biochim. et biophys. Acad. sci. hung.*, 8, 263—267.
25. Kant J., Steck T. (1973) *J. Biol. Chem.*, 248, 8457—8461.
26. Elödi P., Szörenyi E. T. (1956) *Acta physiol. Acad. sci. hung.*, 9, 339—343.
27. Stallcup W. B., Koshland D. E. (1973) *J. Mol. Biol.*, 80, 63—75.
28. Маркович Д. С., Крапивинский Г. Б. (1973) *Биохимия*, 38, 106—112.
29. Szczuk A., Wolny M., Baranowsky T. (1961) *Acta biochim. pol.*, 8, 201—209.

Поступила в редакцию
18.IX.1974

THE INTERACTION BETWEEN D-GLYCERALDEHYDE 3-PHOSPHATE
DEHYDROGENASE AND ATP

KRAPIVINSKY G. B., MARKOVICH D. S.

*Institute of Biological Physics,
Academy of Sciences of the USSR, Pushchino*

D-Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GPD) apoenzyme was shown to bind no more than two moles of ATP, K_d being equal to $2.4 \cdot 10^{-5}$ M. The total number of NAD and ATP molecules does not exceed four per tetramer. It was shown by fluorescence and circular dichroism techniques that ATP induces some conformational changes in GPD molecule with relaxation times ranging from 0.7 to 10 minutes. The changes are all reversible and occur in a wide range of concentration (0.05—3.0 mg/ml) and temperature (0—25°), being independent of these parameters. ATP slowly inhibits the oxidation of glyceraldehyde 3-phosphate, rather than glyceraldehyde. The extent of inhibition is dependent on the enzyme concentration and dissociation, both processes taking place after reversible rearrangement of the tetramer molecule.
