

УДК 577.015.083

НЕКОТОРЫЕ КИНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ АДЕНИЛАТКИНАЗЫ ХЛОРОПЛАСТОВ

ХОЛОДЕНКО Н. Я., КАРТАШОВ И. М., МАКАРОВ А. Д.

Исследовали зависимость активности аденилаткиназы, выделенной из интактных хлоропластов, от концентрации ионов магния и pH среды. Установлено, что оптимальное соотношение ионов магния к субстрату (ADP, АТР+АМР) 1:2, оптимум pH прямой и обратной реакций 7—8. Значения кажущейся константы равновесия (K) аденилаткиназы, определенные в этих условиях двумя способами, получились близкими (0,5 и 0,48). Показано изменение K от pH среды и концентрации ионов магния. Проведенный анализ изменения начальных скоростей реакции при переменной концентрации одних субстратов и постоянной других и при ингибировании продуктом реакции АМР свидетельствует о том, что в двухсубстратной реакции, катализируемой аденилаткиназой хлоропластов, присоединение субстратов и удаление продуктов в большей степени согласуется с неупорядоченным механизмом.

Аденилаткиназа (КФ 2.7.4.3) осуществляет реакцию $2 \text{ ADP} \rightleftharpoons \text{АТР} + \text{АМР}$ и является ключевым ферментом, регулирующим уровень всех 3 нуклеотидов и, следовательно, направленность и интенсивность энергетического метаболизма [1—4]. Активность аденилаткиназы обнаружена в хлоропластах различных растений [5—8]; большая часть фермента локализована в строме [5, 8]. На основании измерения уровня нуклеотидов в интактных хлоропластах предположили [9], что соотношение нуклеотидов контролируется аденилаткиназой. Для понимания механизма регуляции уровня нуклеотидов в хлоропластах важное значение приобретает характеристика кинетических свойств аденилаткиназы, например изучение порядка присоединения субстратов и освобождения конечных продуктов. Кинетические исследования могут быть полезны и для сравнительного анализа аденилаткиназ, локализованных в различных компартментах хлоропластов.

В настоящей работе исследовали влияние pH и ионов магния на активность и константу равновесия аденилаткиназы хлоропластов, провели анализ изменения начальных скоростей реакции при переменной концентрации одних субстратов и постоянной других, изучили ингибирование продуктом реакции АМР.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Получение аденилаткиназы. Аденилаткиназу выделяли из интактных хлоропластов. Выделение хлоропластов вели на холоду по методу, описанному в работе [10]. 1000 г предварительно охлажденных листьев гороха гомогенизировали 5—7 с в универсальном гомогенизаторе при 18 000 об/мин с 3000 мл среды выделения, состоящей из 0,4 М сахарозы, 5 мМ MgCl_2 и 10 мМ $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, pH 8,0. Гомогенат фильтровали через 8 слоев капроновой ткани и центрифугировали 50 с при 2000 g. Полученный осадок осторожно ресуспендировали в 50 мл среды, содержащей 1 М сахарозу, 5 мМ MgCl_2 , 75 мМ NaCl и 10 мМ $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, pH 7,2 и центрифугировали при 4000 g в течение 5 мин. Полученный осадок хлоропластов использовали как исходный материал для выделения аденилаткиназы. Целостность полученных хлоропластов проверяли общепринятым способом, описанным в работе [11]. Обычно препараты содержали 80—85% целых хлоропластов.

Для того чтобы получить аденилаткиназу в растворе, следует разрушить внешние оболочки полученных интактных хлоропластов. Для этого осадок ресуспендировали в 500 мл 0,05 М трис-HCl-буфере, pH 7,8 и оставляли на 2—3 ч, большая часть аденилаткиназы за это время переходит в водную фазу.

Гомогенат центрифугировали при 3000 g 30 мин. Надосадочную жидкость подвергали фракционированному осаждению сернокислым аммонием. Фракцию белка, полученную при 50%-ном насыщении, после центрифугирования при 15 000 g (30 мин) растворяли в 0,05 М трис-HCl-буфере, pH 7,8 из расчета: навеска исходной ткани к объему

буфера 10 : 1. Полученный раствор белка центрифугировали при 15 000 g 30 мин, осадок отбрасывали.

Полученный при таком фракционировании раствор белка обладал наибольшей аденилаткиназной активностью.

Очистку аденилаткиназы, выделенной из интактных хлоропластов гороха, проводили по методу, описанному в работе [6].

Определение активности аденилаткиназы. Аденилаткиназную активность определяли по количеству образованной АТФ (прямое направление) или АДФ (обратное направление). АТФ определяли энзиматическим методом в системе, сопряженной с гексокиназой и глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназой. Состав инкубационной среды для определения АТФ (3 мл) в ммоль: глюкоза — 2; NADP — 0,9; 0,1 мг гексокиназы (500 000 Е/г, «Koch-Light», Швеция); 5 мкг глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы фирмы «Serva» (ФРГ). Количество АДФ также определялось энзиматическим методом в системе, сопряженной с пируваткиназой и лактатдегидрогеназой. Состав инкубационной среды (3 мл) в ммоль: трис-НСl — 5,0; NADH — 0,14; фосфоэнолпируват — 0,5; пируваткиназа — 70 мкг («Reanal», Венгрия), лактатдегидрогеназа — 150 мкг («Reanal»). Концентрации нуклеотидов и магния указаны в подписях к рисункам. Реакцию начинали добавлением очищенной аденилаткиназы (70—80 мкг). Температура инкубации 24°. Количество АТФ и АДФ рассчитывали, умножая оптическую плотность на коэффициент 0,482 ($A_{340}^{1\text{см}} \times 0,482$ мкмоль/мл). Белок определяли модифицированным методом Лоури [12].

Хроматографическое разделение нуклеотидов АТФ, АДФ, АМР осуществляли на бумаге FN 12 в системе растворителей: изопропанол — 1%-ный сульфат аммония (2 : 1). Перед хроматографией бумагу предварительно промывали раствором данной системы. Нуклеотиды элюировали 0,1 н. раствором HCl и их концентрацию с учетом разбавления определяли на спектрофотометре СФ-4А. Начальные скорости реакции определяли, исходя из линейной зависимости в первые минуты инкубации фермента с субстратами по увеличению поглощения при 340 нм для прямой реакции или по уменьшению — для обратной на регистрирующих спектрофотометрах Specord UV VIS (ГДР), Hitachi 356 (Япония). Для расчета количества Mg-АДФ и АДФ использовали константу стабильности — 2500 М⁻¹ [13].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что ионы магния и рН реакционной среды оказывают существенное влияние на активность аденилаткиназ, выделенных из различных источников [6, 7]. В регуляции активности хлоропластной аденилаткиназы оба указанных параметра могут играть роль физиологических факторов, поскольку они изменяются в процессе фотосинтеза [14, 15]. В связи с этим в первой серии опытов исследовали влияние ионов магния и рН реакционной среды на аденилаткиназную активность с целью определить оптимальное соотношение магни/нуклеотиды.

Как видно из рис. 1, оптимальная концентрация магния для прямой реакции соответствует соотношению $\text{Mg}^{2+}/\text{ADP} = 1/2$, в обратной реакции — $\text{Mg}^{2+}/\text{ATP} = 1$.

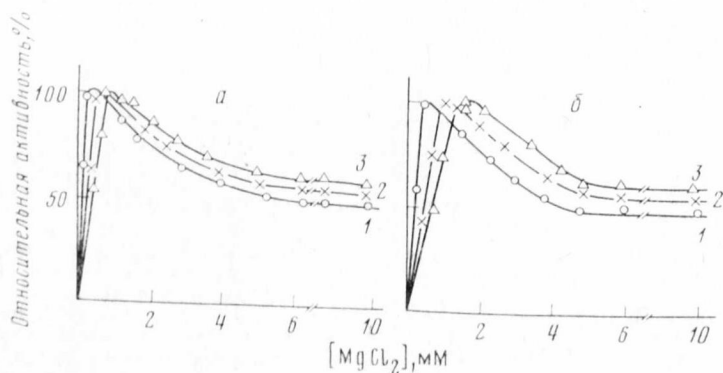
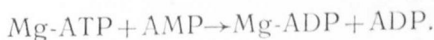
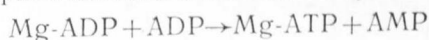


Рис. 1. Зависимость скорости реакции от концентрации магния. а — прямое направление, концентрация АДФ мМ: 1 — 0,5; 2 — 1,0; 3 — 1,5; б — обратное направление, концентрация нуклеотидов, мМ: АМР — 1; АТФ: 1 — 0,5; 2 — 1,0; 3 — 1,5

Как в прямом, так и в обратном направлениях последующее увеличение концентрации магния ингибирует процесс. В отсутствие ионов магния фермент не проявляет активности.

В целом полученные данные могут быть объяснены тем, что истинными субстратами процесса являются хелатные комплексы магния аде-

нин-ди- и трифосфорной кислоты и свободные нуклеотиды [16]:



Следует отметить, что для аденилаткиназы, выделенной из оболочек хлоропластов, не наблюдается ингибирование реакции высокими концентрациями магния [8].

Влияние pH на активность аденилаткиназы из хлоропластов было изучено в области pH 6—10. Результаты, представленные на рис. 2, указывают, что более 60% от максимальной активности наблюдается при pH 6,0 и $\approx 55\%$ при pH 10. Аналогичная зависимость от pH отмечается и для обратной реакции: активность при pH 6,0 составляет 60%, а при pH 10—40%. В обоих направлениях максимальная активность наблюдается в области pH 7—8.

Существенное значение для понимания регуляторных свойств фермента имеет определение величины константы равновесия: $K = [\text{ATP}][\text{AMP}]/[\text{ADP}][\text{ADP}]$.

Известно несколько способов практического определения кажущейся константы равновесия для реакций, катализируемых ферментами [17]. В данной работе использовали наиболее простой метод, основанный на том, что субстраты реакции смешивали с очищенной аденилаткиназой и инкубацию продолжали до тех пор, пока реакция не достигала равновесия. Критерием достижения равновесия являлось постоянство концентрации субстратов и продуктов при инкубации их с ферментом в течение 1—3 ч. После достижения равновесия реакцию останавливали добавлением 20%-ной трихлоруксусной кислоты и нейтрализовали насыщенным раствором Na_2CO_3 до pH 7,5. Концентрацию субстратов и продуктов измеряли хроматографическим и энзиматическим методами. В пределах экспериментальной ошибки получены близкие результаты с использованием обеих методик.

Вначале определили кажущуюся константу в обоих направлениях реакции $2 \text{ ADP} \rightleftharpoons \text{ATP} + \text{AMP}$ при pH 8,0 и отношении ионов магния к нуклеотидам $\text{Mg}^{2+}/\text{ADP} = 1/2$ в прямой реакции и $\text{Mg}^{2+}/\text{ATP} = 1$ в обратной. Концентрация ADP составляла 2 мМ, AMP и ATP — по 1 мМ.

Значения константы равновесия аденилаткиназной реакции, определенные двумя способами, получались близкими и равнялись 0,5 для прямой и 0,48 — для обратной реакций.

Эти величины практически совпадают со значениями констант равновесия аденилаткиназ, выделенных из других источников [18].

Как видно из рис. 3, ионы магния и pH существенно влияют на величину кажущейся константы равновесия, причем при низких и высоких концентрациях ионов Mg^{2+} наблюдается соответственно увеличение и уменьшение константы равновесия. Такое изменение константы равновесия под действием Mg^{2+} может иметь регуляторное значение для процесса фотофосфорилирования. Например, при уменьшении константы равновесия в условиях повышенных концентраций ионов Mg^{2+} реакция может сдвигаться в сторону синтеза ADP, вследствие чего повышается концентрация субстрата для процесса фотофосфорилирования и одновременно уменьшается концентрация AMP. Последний, как известно, генерируется вследствие фотосинтетических реакций [4], а увеличение Mg^{2+} в строме хлоропластов может быть вызвано $\text{Mg}^{2+}/\text{H}^+$ -обменом через тилакоидную мембрану [14, 15].

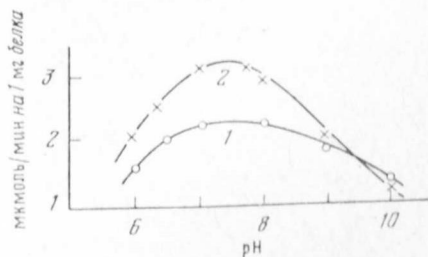


Рис. 2. Влияние pH на активность аденилаткиназы. 1 — прямая реакция (ADP 1,0 мМ, Mg^{2+} 0,5 мМ); 2 — обратная реакция (AMP 1 мМ, ATP 1 мМ, Mg^{2+} 1 мМ)

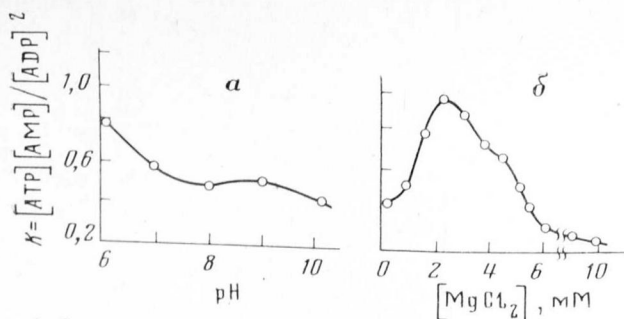


Рис. 3. Влияние pH и Mg^{2+} на кажущуюся константу равновесия. а — зависимость от pH (ADP 2 мМ; Mg^{2+} 1 мМ); б — зависимость от концентрации ионов магния (ADP 2 мМ, pH 8,0)

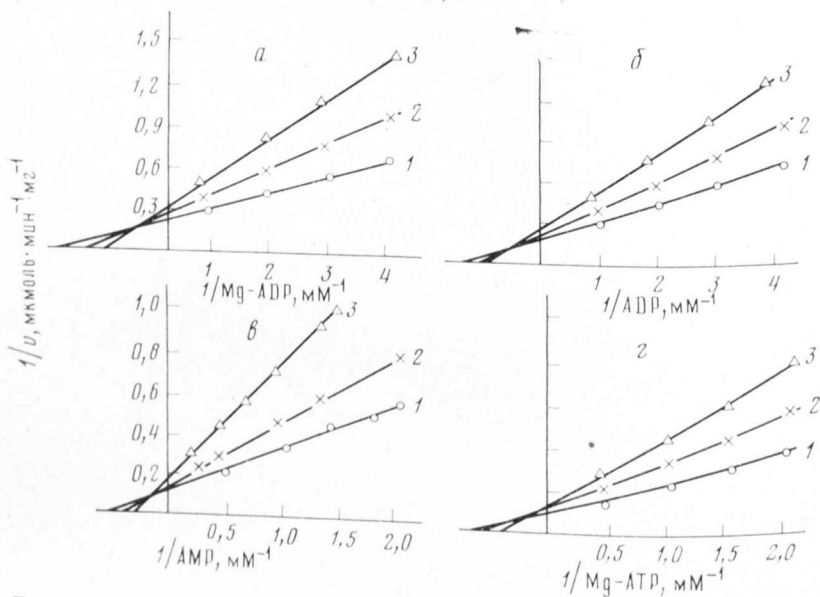


Рис. 4. Графики Лайнуивера — Берка для действия хлоропластов: а — переменная концентрация Mg-ADP и постоянная концентрация ADP мМ (1—0,2; 2—0,5; 3—1); б — переменная концентрация ADP и постоянная Mg-ADP, мМ (1—0,2; 2—0,5; 3—1); в — переменная концентрация AMP и постоянная Mg-ATP мМ (1—0,5; 2—1,0; 3—1,5), $Mg/ATP=1$; г — переменная Mg-ATP ($Mg/ATP=1$) постоянная AMP, мМ (1—0,5; 2—1,0; 3—1,5)

Важной характеристикой в изучении кинетики двухсубстратных реакций является выяснение порядка присоединения субстратов к молекуле фермента и освобождения конечных продуктов. Клиленд [19] рассматривает следующие возможности последовательности стадий в двухсубстратных ферментативных реакциях: а) если связывание обоих субстратов реакции предшествует освобождению продуктов — это последовательный механизм (sequential). В случае, когда связывание субстратов и освобождение продуктов подчиняется определенному порядку, механизм называется упорядоченным (ordered). При отсутствии определенного порядка в связывании субстратов и отщеплении продуктов реакция механизма называется неупорядоченным (random); б) двухсубстратные реакции могут протекать по так называемому механизму пинг-понг (ping-pong), при котором после присоединения первого субстрата освобождается первый продукт реакции до присоединения второго субстрата.

С целью выяснения возможного механизма действия аденилаткиназы хлоропластов мы исследовали стационарную кинетику реакции

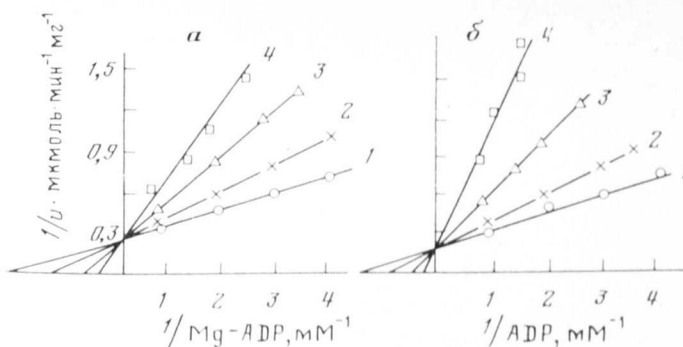


Рис. 5. Ингибирование продуктом реакции (AMP): а — переменная концентрация Mg-ADP и постоянная ADP: — 1 мМ; AMP, мМ (1 — 0; 2 — 0,2; 3 — 1,0; 4 — 2,0); б — переменная концентрация ADP и постоянная Mg-ADP — 1 мМ; AMP, мМ (1 — 0; 2 — 0,2; 3 — 1,0; 4 — 2,0)

$2 \text{ ADP} \rightleftharpoons \text{ATP} + \text{AMP}$. Было проведено несколько серий опытов: в одной серии измеряли начальные скорости реакции при нескольких постоянных концентрациях ADP и переменных Mg-ADP. Во второй серии опытов варьировали концентрации ADP при неизменных концентрациях Mg-ADP. Результаты экспериментов представлены на рис. 4 в координатах Лайнуивера — Берка.

Как следует из рис. 4, в прямой реакции $2 \text{ ADP} \rightleftharpoons \text{ATP} + \text{AMP}$, где Mg-ADP или ADP были переменными субстратами, графики состоят из прямых линий и имеют общую точку пересечения. Аналогичная зависимость начальной скорости наблюдается и в обратной реакции с Mg-ATP и AMP, как переменными субстратами.

Отсутствие параллелизма прямых в обратных координатах и их пересечение в одной точке исключает механизм типа пинг-понг и в большей степени согласуется с последовательными механизмами: упорядоченным или неупорядоченным. Отличительной чертой упорядоченного механизма является конкурентное ингибирование между первым добавленным субстратом и последним удаленным продуктом, в то время как другие субстраты и продукты вызывают неконкурентное ингибирование.

Результаты исследований ингибирования аденилаткиназной реакции AMP представлены на рис. 5. Как видно из рисунка, AMP как продукт реакции является конкурентным ингибитором субстратов Mg-ADP и ADP.

Конкурентный характер ингибирования продуктом свидетельствует о том, что данная реакция в большей степени согласуется с неупорядоченным Vi-Vi-механизмом, который включает формирование тройного фермент-субстратного комплекса. Однако для окончательного вывода о последовательности присоединения субстратов к ферменту в процессе реакции целесообразно проведение в дальнейшем исследований с использованием метода изотопного обмена.

ЛИТЕРАТУРА

1. Котельникова А. В. Биохимия, 1953, т. 18, № 5, с. 522—530.
2. Bomsel J. L., Pradet A. Biochim. et biophys. acta, 1968, v. 162, № 2, p. 230—242.
3. Atkinson D. E. Biochemistry, 1968, v. 7, № 11, p. 4030—4034.
4. Santarius K. A., Heber U. Biochim. et biophys. acta, 1965, v. 102, № 1, p. 39—54.
5. Kari A. E., Moudrianakis E. N. Arch. Biochem. and Biophys., 1969, v. 129, № 2, 655—671.
6. Родионова М. А., Кузьмин А. Н., Холоденко Н. Я., Макаров А. Д. Физиол. раст., 1976, т. 23, № 4, с. 847—849.
7. Родионова М. А., Холоденко Н. Я., Макаров А. Д. Физиол. раст., 1978, т. 25, № 4, с. 731—734.
8. Murakami S., Stroimann H. Arch. Biochem. and Biophys., 1978, v. 185, № 1, 30—38.

9. Kobayashi Y., Inoue Y., Furuya F., Shibata K., Heber U. *Planta*, 1979, v. 147, p. 69—75.
10. Hashimoto H., Murakami S. *Plant and cell Physiol.*, 1975, v. 16, № 5, p. 895—902.
11. Heber U., Santarius K. A. *Z. Naturforsch. b*, 1970, B. 25, S. 718—728.
12. Schacterle G. R., Pollack R. L. *Analyt. Biochem.*, 1973, v. 51, № 2, p. 654—655.
13. Khoo John C., Russell Percy J., Jr. *J. Biol. Chem.*, 1970, v. 245, № 16, p. 4163—4167.
14. Бульчев А. А. *Итоги науки и техники, ВИИТИ, Физиол. раст.*, 1980, т. 4, с. 126—174.
15. Krause G. H. *Biochim. et biophys. acta*, 1977, v. 460, p. 500—501.
16. Родионова М. А., Холоденко Н. Я., Макаров А. Д. *Биохимия*, 1976, т. 41, № 11, с. 1934—1938.
17. Ньюсхольм Э., Старт К. В кн.: *Регуляция метаболизма*. М.: Мир, 1977, с. 44—49.
18. Bowen W. J., Kerwin T. D. *Arch. Biochem. and Biophys.*, 1956, v. 64, p. 278—284.
19. Cleland W. W. *Steady State Kinetics. The Enzymes kinetics and mechanis*/Ed. Boyer P. D. N. Y.—London: Acad. Press, 1970, v. 11, p. 1—65.

Институт фотосинтеза АН СССР,
г. Пушкино Московской области

Поступила в редакцию
29.III.1982

SOME KINETIC PROPERTIES OF CHLOROPLAST ADENYLATE KINASE

KHOLODENKO N. Ya., KARTASHOV I. M., MAKAROV A. D.

Institute of Photosynthesis, USSR Academy of Sciences, Pushchino

The dependence of adenylate kinase activity of native chloroplasts on Mg^{2+} concentration and pH was studied. The optimal Mg^{2+} /substrate (ADP, ATP+AMP) ratio is equal to 1 : 2, the pH optimum for the direct and reverse reactions is 7—8. The values of the apparent equilibrium constant, K , for the enzyme as determined by two methods appeared to be close (0.5 and 0.48, respectively). The value of K was variable depending on pH and Mg^{2+} concentration. The changes in the initial reaction rates at variable concentrations of some substrates and at steady concentrations of others as well as the type of inhibition by the AMP reaction product suggest that in the two-substrate reaction catalyzed by chloroplast adenylate kinase the binding of the substrate and the removal of the reaction product largely occur in accordance with a sequential random mechanism.