

УДК 577.113.3:591.111.1

РЕГУЛЯТОРНАЯ РОЛЬ ТРАНСКЕТОЛАЗЫ И НЕКОТОРЫХ МЕТАБОЛИТОВ ПЕНТОЗОФОСФАТНОГО ПУТИ В СИНТЕЗЕ ФОСФОРИБОЗИЛПИРОФОСФАТА ГЕМОЛИЗАТАМИ ЭРИТРОЦИТОВ

В.Л. Кубышин, к.б.н., доцент; З.В. Горбач, д.б.н., профессор;

Е.В. Мальевская

Кафедра химии

УО «Гродненский государственный аграрный университет»

Исследовано влияние метаболитов пентозофосфатного пути рибозо-5-фосфата, равновесной смеси пентозофосфатов (рибозо-5-фосфата, ксилулозо-5-фосфата, рибулозо-5-фосфата), глюкозо-6-фосфата, АТФ, P_i на синтез фосфорибозилпирофосфата в гемолизатах эритроцитов крыс. Показано, что фосфорибозилпирофосфат синтетазы эритроцитов высоко чувствительна к изменению концентраций рибозо-5-фосфата с величиной K_m = 0,18 мМ, АТФ (K_m = 0,36 мМ), пентозофосфатов, глюкозо-6-фосфата, P_i. Внесение высокоочищенного препарата транскетолазы в поликомпонентную систему гемолизатов эритроцитов сопровождается значительным блокированием биосинтеза фосфорибозилпирофосфата. Установленный эффект транскетолазы, вероятно, обусловлен влиянием на концентрацию пентозофосфатов, а также не исключена роль продуктов транскетолазной реакции, действующих как ингибиторов фосфорибозилпирофосфат синтетазы.

Ключевые слова: фосфорибозилпирофосфат; пентозофосфатный путь; транскетолаза; эритроциты.

The influence of metabolites of pentose phosphate pathway such as ribose-5-phosphate, an equilibrium mix of pentose phosphates (ribose-5-phosphate, xylulose-5-phosphate, ribulose-5-phosphate), glucose-6-phosphate, as well as ATP and P_i on the synthesis of phosphoribosylpyrophosphate in erythrocyte hemolysates of rats was investigated. It is shown, that phosphoribosylpyrophosphate synthetase of erythrocytes is highly sensitive to the changes in concentration of ribose-5-phosphate (K_m = 0,18mM, ATP-K_m = 0,36mM), pentose phosphates, glucose-6-phosphate, as well as of P_i. The addition of a purified transketolase to hemolysate erythrocytes is accompanied by the significant blocking of phosphoribosylpyrophosphate biosynthesis. The effect of transketolase is supposed to be due to its influence on pentose phosphates concentration. The role of the products of transketolase reactions, operating as inhibitors of phosphoribosylpyrophosphate synthetase is not excluded as well.

Key words: phosphoribosylpyrophosphate; pentose phosphate pathway; transketolase; erythrocytes.

Синтез внутриклеточных нуклеотидов осуществляется при участии таких ферментов, как гипоксантингуанинфосфорибозилтрансферазы (ГГФРТ), аденинфосфорибозилтрансферазы (АФРТ) и во многом зависит от концентрации фосфорибозилпирофосфата (ФРПФ), синтезирующегося из рибозо-5-фосфата (Р-5-Ф) и АТФ в фосфорибозилпирофосфатсинтезной реакции (ФРПФС). Ферментативную активность ФРПФС можно рассматривать как одно из существенных регуляторных звеньев формирования нуклеотидов путем *de novo* синтеза. Другим важным фактором синтеза нуклеотидов является концентрация ФРПФ в тканях, которая зависит от доступности одного из предшественников Р-5-Ф [5, 14]. Р-5-Ф, субстрат ФРПФС синтезной реакции, синтезируется в тканях преимущественно окислительными и неокислительными реакциями пентозофосфатного пути, где на долю неокислительных реакций, для эритроцитов человека, приходится до 80% [17]. В работах [13, 9] показано, что недостаточность или полное отсутствие глюкозо-6-фосфатдегидрогеназной реакции в эритроцитах не влияет на стационарную концентрацию ФРПФ. Эти данные характеризуют транскетолазно-трансальдолазную реакцию как важное регуляторное звено в клеточном синтезе рассматриваемого метаболита, где транскетолаза характеризуется как лимитирующее звено.

В данной работе проведены исследования роли транскетолазы (ТК) во внутриклеточном синтезе ФРПФ в эритроцитах, а также влияние некоторых метаболитов ППФ.

Материалы и методы

Гемолизаты эритроцитов готовили следующим образом. Кровь белых беспородных крыс собирали в пробирки с гепарином. Эритроциты отделяли от плазмы путем центрифугирования, двукратно промывали физи-

ологическим раствором, и затем лизировали внесением двух объемов дистиллированной воды по отношению к объему упакованных эритроцитов. Гемолизированные эритроциты центрифугировали 30 минут на холоду при 1700g и сохраняли в холодильнике при – 10°C для последующих экспериментов. После размораживания гемолизаты центрифугировали на холоду и полученный супернатант использовали как источник ферментов в синтезе ¹⁴С-ИМФ.

Синтез ¹⁴С-ИМФ лизированным препаратом эритроцитов осуществляли следующим образом. Реакционная смесь для определения активности ГГФРТ состояла из: 0,1 мл трис-НСI буферного раствора pH 7,4, содержащего 5мМ хлористого магния, ФРПФ в качестве субстрата, 0,1 мл ¹⁴С-гипоксантина (0,08 МБк), 0,1 мл гемолизата, 0,005 мл 0,4М калий-фосфатного буфера pH 7,4. При определении активности синтетазы ФРПФ использовали смесь для определения активности ГГФРТ, где вместо ФРПФ использовали Р-5-Ф или же пентозофосфатную смесь в концентрациях, указанных в подписях к рисункам. Разделение меченых субстратов и продуктов реакции проводили методом восходящей тонкослойной хроматографии на пластинках силуфол в течение 1,5 часа смесью, содержащей бутанол:метанол (25%):аммиак:вода в соотношении 60 : 20 : 1 : 20 по объему. R_f для гипоксантина – 0,36, для ИМФ-0,07. Измерение радиоактивности продуктов реакции, элюированных с хроматографической пластинки в течение 1 часа водой, проводили на жидкостном сцинтилляционном счетчике Нуклеар Чикаго.

Материалы: [¹⁴С]-гипоксантин, ФРПФ фирмы «Серва», Р-5-Ф – «Реанал» (Венгрия). Пентозофосфатная смесь (ПФ) синтезировалась по методу [1].

Транскетолазу получали с помощью ионообменной хроматографии на фосфоцеллюлозе [2] и адсорбционной на гидроксилпатите [4]. Чистоту ферментного препарата характеризовали по удельной активности, которую определяли на спектрофотометре SPECORD UV VIS с использованием вспомогательных ферментов: α-глицерофосфатдегидрогеназы, триозофосфатизомеразы, изомеразы и эпимеразы пентозофосфатов [1]. В качестве субстрата использовали рибозо-5-фосфат.

Результаты и их обсуждение

В экспериментах установлено, что гемолизаты эритроцитов интенсивно синтезируют ФРПФ из Р-5-Ф и АТФ и утилизируют его в реакции конденсации с азотистыми основаниями (рис. 1).

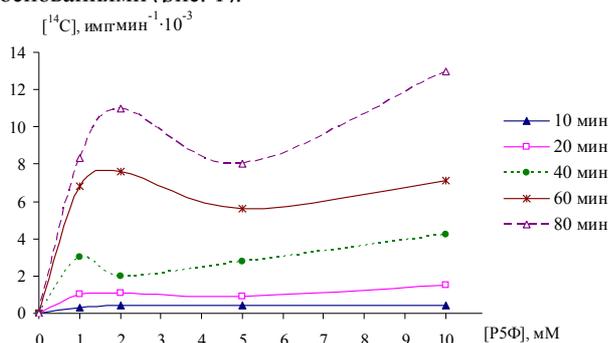
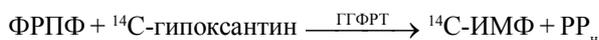


Рисунок 1 – Синтез $[^{14}\text{C}]$ -ИМФ лизатами эритроцитов в зависимости от времени инкубации и концентрации экзогенного Р-5-Ф

Используя Р-5-Ф или ФРПФ, в качестве субстратов проводили дифференциальное определение активности синтетазы ФРПФ и ГГФРТ, катализирующих следующие реакции.



Скорость синтеза $[^{14}\text{C}]$ -ИМФ существенно различается в зависимости от использованного субстрата, указывая, что активность ГГФРТ значительно выше синтетазы ФРПФ (рис. 2).

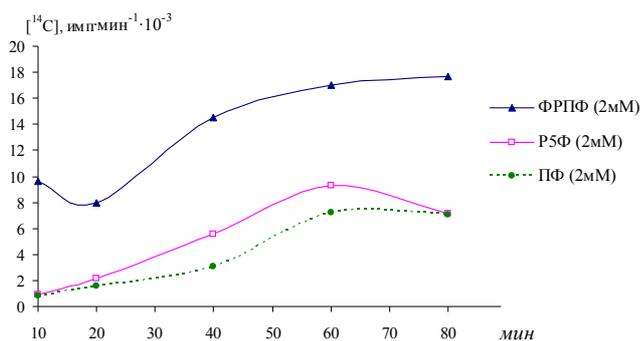


Рисунок 2 – Синтез $[^{14}\text{C}]$ -ИМФ лизатами эритроцитов в зависимости от длительности инкубации с ФРПФ, Р5Ф, ПФ

Учитывая это обстоятельство, характеризующее указанный объект как удобную биохимическую систему, проведено изучение регуляторных свойств различных внутриклеточных интермедиатов ПФП на активность синтетазы ФРПФ. Высокая чувствительность ФРПФ синтетазы к изменению концентрации Р-5-Ф показана в экспериментах, где варьировали уровень Р-5-Ф при фиксированной величине АТФ (рис. 3).

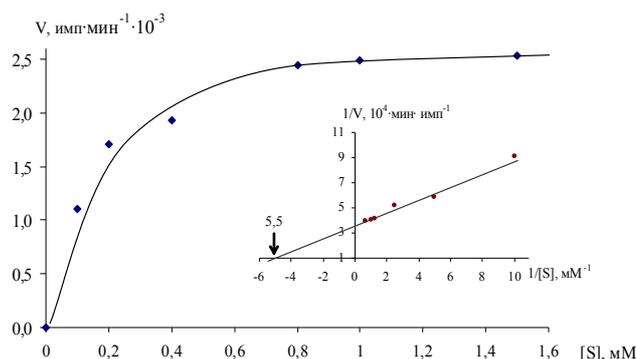


Рисунок 3 – Зависимость начальной скорости (ФРПФ) реакции от концентрации Р-5-Ф

При концентрации Р-5-Ф, равной 1 мМ, практически достигается субстратное насыщение, так как кажущееся значение K_m по субстрату составляет 0,18 мМ, что по абсолютной величине сравнимо с аналогичным параметром для очищенного фермента из печени крысы [6], шпината [10]. А так как внутриклеточная концентрация Р-5-Ф в тканях животных существенно ниже величины K_m ФРПФ синтетазы по субстрату [7, 15], это дает основание оценивать Р-5-Ф в качестве одного из возможных регуляторов во внутриклеточном синтезе ФРПФ и зависимых от него процессов.

В поликомпонентной системе гемолизатов эритроцитов экзогенный Р-5-Ф под действием неокислительных ферментов рибозо-5-фосфатизомеразы и рибулозо-5-фосфатэпимеразы превращается в равновесную смесь фосфопентоз, состоящей из рибозо-5-фосфата, ксилулозо-5-фосфата, рибулозо-5-фосфата. В наших экспериментах соотношение пентозофосфатов составило, соответственно, 53%, 27%, 17%. Для того чтобы охарактеризовать возможные эффекты пентозофосфатных превращений на синтез ФРПФ, сравнивали воздействие пентозофосфатов и Р-5-Ф в равных концентрациях. В экспериментах установлена их равнозначность как предшественников в синтезе ФРПФ (рис. 2).

При высоких концентрациях как Р-5-Ф, так и АТФ наблюдается эффект субстратного ингибирования ФРПФ синтетазы. При высоких концентрациях как Р-5-Ф, так и АТФ наблюдается эффект субстратного ингибирования ФРПФ синтетазы (рис. 3). Значение K_m ФРПФ синтетазной реакции для АТФ значительно ниже внутриклеточной концентрации нуклеотида и, следовательно, этот фактор оказывает менее существенное влияние на клеточный синтез ФРПФ (рис. 4).

Эндогенный уровень концентраций субстратов-предшественников ФРПФ обеспечивает относительно невысокие скорости его синтеза в эритроцитах. Лимитирование биосинтеза обуславливается пентозным компонентом, так как внесение Р-5-Ф или смеси фосфопентоз резко активирует этот процесс. Существенная роль Р-5-Ф в обмене ФРПФ затрагивает вопрос о путях его внутриклеточной наработки и механизмах регуляции биосинтеза интермедиатов. Основным источником фосфопентоз в клетке являются окислительные и неокислительные реакции пентозного цикла, который можно рассматривать как два независимых пути формирования Р-5-Ф. Окислительная ветвь характеризуется векторностью в синтезе фосфопентозы, тогда как неокислительными транскетолазо-трансальдолазными превращениями углеводов осуществляется как синтез, так и утилизация фосфорилированных сахаров. Вклад неокислительных реакций в наработку фосфопентоз преобладает [17]. Транскетолазу

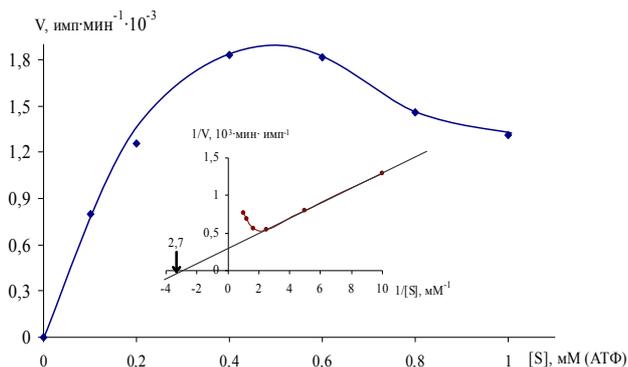


Рисунок 4 – Зависимость скорости (ФРПФС) реакции от концентрации АТФ

можно рассматривать как фермент, занимающий ключевую позицию в переключении гликолитического метаболического потока на пентозофосфатный путь, поставляющий рибозный компонент для синтеза нуклеотидов, и роль обратимых транскетолазных реакций в сохранении гомеостатического баланса фосфорилированных сахаров в тканях остается предметом исследований.

Частичное или полное блокирование активности ТК в микроорганизмах сопровождается накоплением Р-5-Ф [10]. Отмечается повышенное содержание пентозофосфатов в ткани печени тиаминдефицитных крыс, характеризующихся сниженной активностью ТК [7]. Критерием, характеризующим транскетолазную реакцию как «лимитирующее звено», выступают данные по сравнительной оценке активности ферментов неокислительной ветви ПФП [8], что свидетельствует в пользу равновесной регуляции внутриклеточных метаболитов транскетолазой. Константа равновесия для ТК печени крысы, полученная *in vitro* с такими субстратами, как Р-5-Ф и К-5-Ф, равнялась 0,59. Константа равновесия, полученная теоретически из внутриклеточного содержания Р-5-Ф [11], седогептулозо-7-фосфата [12], К-5-Ф и глицеральдегид-3-фосфата [8], в печени крысы приближается к этому значению и составляет 0,5. Полученные данные позволяют рассматривать транскетолазную реакцию как систему с равновесным контролем, где концентрации реагирующих субстратов и продуктов реакции есть факторы определяющие направление метаболического потока. По мнению М.Кларка, снижение активности ТК реакции можно рассматривать как фактор сохранения фонда Р-5-Ф. В наших экспериментах изменение активности ТК в гемолизатах эритроцитов посредством внесения высокоочищенного фермента приводит к существенному ингибированию синтеза ИМФ, (рис. 5).

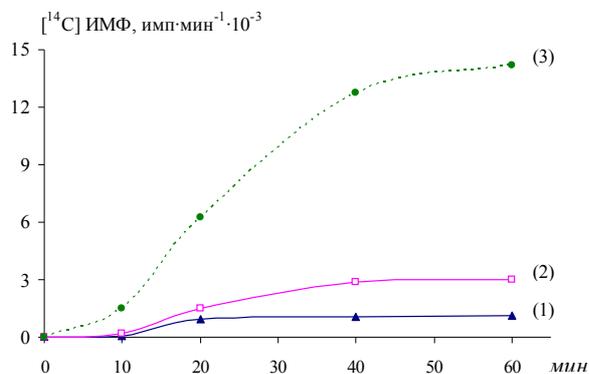


Рисунок 5 – Скорость синтеза ИМФ гемолизатами в зависимости от времени инкубации и концентрации ТК. Активность ТК в МЕ: 1) 0,06; 2) 0,03; 3) без внесения фермента

С увеличением активности вносимого высокоочищенного препарата ТК это действие усиливалось. Следовательно, изменение активности ТК можно рассматривать как регуляторный фактор, контролирующий уровень концентрации Р-5-Ф субстрата-предшественника ФРПФ. Так как ингибирование ФРПФС реакции зависело от длительности инкубации гемолизатов с экзогенной ТК, есть основание предположить о существенной регуляторной роли продуктов транскетолазных реакций в изучаемый процесс.

Возможное влияние субстратов гликолиза фосфорилированных гексоз на синтез ФРПФ изучали в экспериментах, где установлено, что преинкубация гемолизатов эритроцитов крыс с глюкозо-6-фосфатом в различных концентрациях заметно снижает наработку ФРПФ (рис. 6).

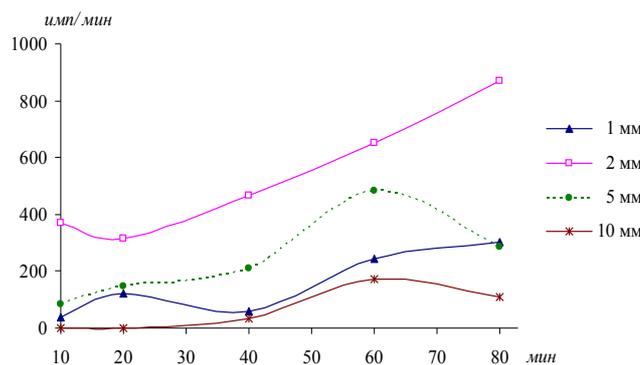


Рисунок 6 – Синтез ФРПФ в зависимости от концентрации глюкозо-6-фосфата

Следовательно помимо эффекторного действия Р-5-Ф, синтез ФРПФ в клетке находится под контролем глюкозо-6-фосфата и, возможно, других фосфорилированных сахаров.

В экспериментах проведены исследования по влиянию Р_и на синтез ФРПФ (рис. 7).

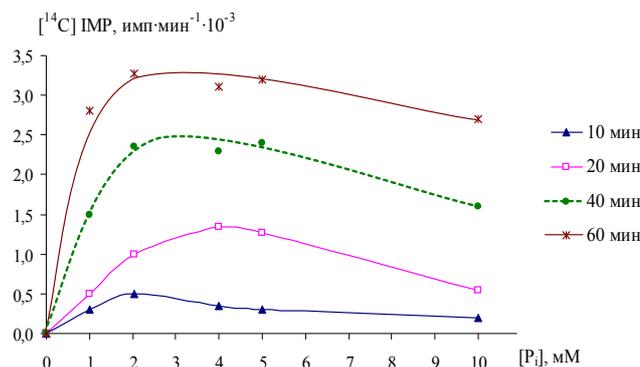


Рисунок 7 – Влияние концентрации Р_и на доступность ФРПФ в синтезе ИМФ гемолизатами эритроцитов крыс в зависимости от времени преинкубации

В этой связи действие Р_и, известного активатора клеточного синтеза ФРПФ, вероятно, имеет комплексный характер и возможна реализация не только аллостерического механизма активации ФРПФС, но также и ингибирование транскетолазы [7], активация гексокиназы, фосфофруктокиназы и усиление синтеза фосфопентоз [10]. Р-5-Ф оказывает существенное влияние на скорость синтеза ФРПФ. Внесение транскетолазы, значительно превышающей активность экзогенного фермента в гемолизатах эритроцитов, сопровождается снижением ско-

рости синтеза ФРПФ. Следовательно, можно предположить, что высокая активность транскетолазы обуславливает интенсивную утилизацию пентозофосфатов, тем самым снижая концентрацию субстрата синтетазы ФРПФ. Однако низкие значения K_m для ФРПФС по Р-5-Ф, а также константа равновесия легко обратимой транскетолазной реакции, значение которой близко 0,5 [4, 8, 11, 12], указывает на малую вероятность предполагаемого механизма. В эффекте транскетолазы на биосинтез ФРПФ гемолизатами эритроцитов, вероятно, решающее значение могут иметь продукты транскетолазной реакции, как возможные ингибиторы синтетазы ФРПФ. Это предположение кажется наиболее вероятным, учитывая влияние глюкозо-6-фосфата на этот процесс.

Литература

1. Кочетов, Г.А. Практическое руководство по энзимологии / Г.А. Кочетов // М., Высш. шк. - 1980. - С. 90-92.
2. Кубышин, В.Л. Некоторые характеристики транскетолазы печени крысы / В.Л. Кубышин, З.В. Горбач // Украинский биохимический журнал. - 1985. - т.57. - №2. - С. 37-41.
3. Метаболические эффекты, связанные с ингибированием транскетолазы / З.В. Горбач [и др.] // Вопросы мед.химии. - 1980. - №5. - С. 608-611.
4. Очистка и свойства транскетолазы печени крыс / З.В. Горбач [и др.] // Биохимия. - 1981. - т.46. - вып. 11. - С. 1963-1969.
5. Becker, M.A. Synthesis of phosphoribosylpyrophosphate in mammalian cells / M.A. Becker, K.O. Raivio, J.E. Seegmiller // Adv. in enzymol. - 1979. - v.49. - P. 281-306.
6. Belo-Banga, J.M. Increased 5-phospho-d-ribose-1 diphosphatesynthetase activity in rat hepatomas / J.M. Belo-Banga, G. Weber // Cancer Research. - 1984. -v.11. - P. 5007-5009.
7. Casazza, J.P. The content of pentose cycle intermediates in liver starved fed ad libitum and mealated rabs / J.P. Casazza, R.L. Veech // J. Biochem. - 1986. - v.261. - №2. - P. 690-698.
8. Effects of theroid hormone deficiency on the distribution of hepatic metabolites and control of pathways of carbohydrate metabolism in liver and adipose tissue of the rat / N.Z. Bequer [et al.] // Europ.J.Biochem. - 1976. - v.68. -P. 403- 414.
9. Hershko, A. Phosphoribosilpyrophosphate synthesis in human red blood cells and cell-free preparates / A. Hershko, A. RazinA, J. Mador // B.B.A. - 1969. - v.184. - №1. - P. 64-76.
10. Krath, B.N. Implication of secondary structure prediction and amino acid sequence comparison of class I and class II phosphoribosyl diphosphate synthases on catalysis, regulation, and quaternary structure / B.N. Krath, B. Hove-Jensen / Protein Sci. - 2001. - N10. - P. 2317-2324.
11. Lipstein, B. Regulation of *de novo* purin synthesis in chick lever slices.- Rol of phosphoribosylpyrophosphate availability and of salvage purin nucleotide synthesis / B. Lipstein, P. Boer, O. Sperling // Biochem. et biophys. acta. - 1978. - v. 521. - P. 45-54.
12. Paoletti, F. Detection and estimation of sedoheptulose and octulose mono and bisphosphate in extracts of rat liver / F. Paoletti, J.F. Williams, B.L. Horecher // Arch. Biochem. and Biophys. - 1979. - v. 198. - P. 620-626.
13. Pescermona, G.P. Regulation of NAD and NADH synthesis in human red cells / G.P. Pescermona, A. Bosia // Acta boil.et med ger. - 1977. - v. 36. - №5. - P. 759-763.
14. Phosphoribosylpyrophosphate syntetase in human erythrocytes: assay and kinetic stadies using high-performance liquid chromatography / R. Sakuma [et al.] // Clin.Chim.Acta. - 1991. - N16. - P. 143-152.
15. Regulatory properties of rabbit red blood cell hexokinaase at conditions close to physiological / M. Magnani [et al.] // Bioch.et Biophys. Acta. - 1984. - v.804. -№2. - P. 145-153.
16. Sasajima, K. Change in the regulation of enzyme synthesis under catabol. Repress. in Bacillus pleiotropic / K. Sasajima, T. Kumada // Agr. Biol.Chem. - 1981. - v.45. - N9. - P. 2005-2012.
17. Yen, G.C. Pyrroline-5-carboxylates stimulates the conversion of purine antimetabolites to their nucleotide forms by redox-dependent mechanism / G.C. Yen, J.M. Phang // J.Biol.Chem. - 1983. - V. 258. - P. 9774-9779.

Поступила 09.12.09