

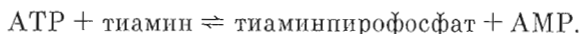


УДК 577.15.08:543.544

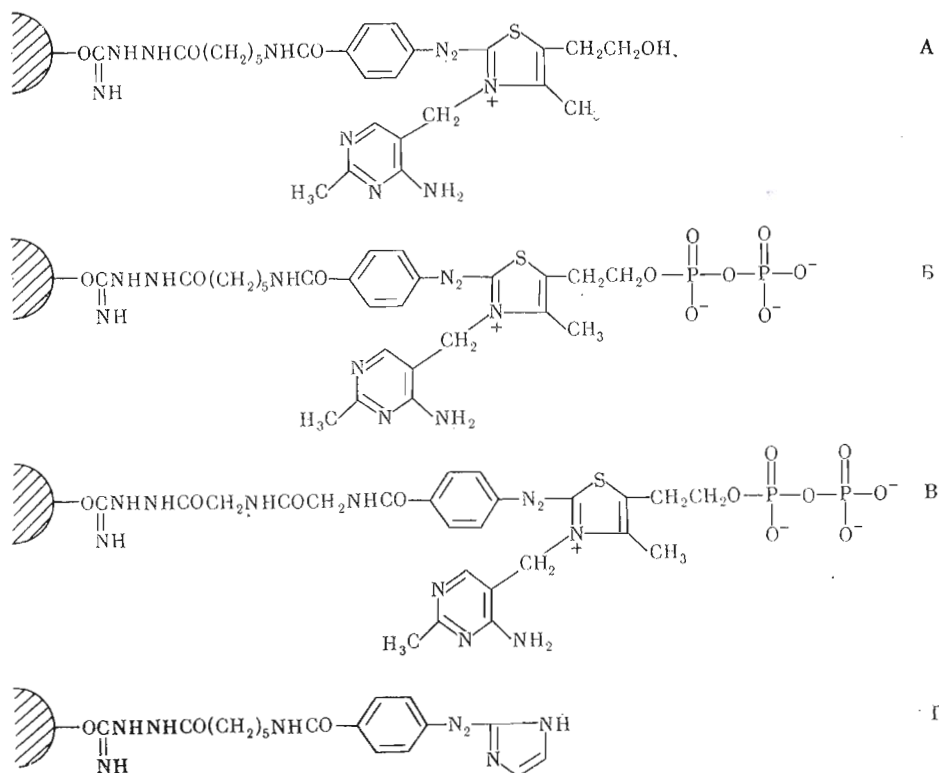
ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА БИОПОЛИМЕРОВ МЕТОДОМ
АФФИННОЙ ХРОМАТОГРАФИИVII*. ОЧИСТКА ДРОЖЖЕВОЙ ТИАМИНПИРОФОСФОКИНАЗЫ ХРОМАТОГРАФИЕЙ
НА АФФИННЫХ АДсорБЕНТАХ*Черникевич И. П., Воскобоев А. И.**Отдел регуляции обмена веществ Академии наук БССР, Гродно**Кляцицкий Б. А.**Институт биологической и медицинской химии
Академии медицинских наук СССР, Москва*

Проведена хроматография тиаминпирозофосфокиназы (КФ 2.7.6.2) из пивных дрожжей на аффинных адсорбентах, содержащих в качестве лиганда тиамин, тиаминпирозофосфат или имидазол, не имеющих катионного заряда в месте присоединения вставки к носителю и различающихся степенью гидрофобности. Установлено, что гидрофобные и электростатические взаимодействия существенно не влияют на связывание фермента. Описаны методы получения электрофоретически гомогенных препаратов тиаминпирозофосфокиназы, включающие на начальной или заключительной стадиях аффинную хроматографию на тиаминпирозофосфат-N-4-азобензоилглицилглицинсефарозе с выходом 89 или 72% и степенью очистки 58 или 1200 раз.

Аффинная хроматография на биоспецифических адсорбентах, содержащих в качестве лигандов тиамин или его пирозофосфорные эфиры, находит все более широкое применение в витаминологии для очистки тиаминсвязывающих белков [1] и тиаминпирозофосфатзависимых ферментов [2-4]. В работе [5] описана аффинная хроматография тиаминпирозофосфатзависимой пируватдекарбоксилазы из пивных дрожжей на новых тиаминсодержащих биоспецифических адсорбентах, не имеющих катионного заряда в месте присоединения вставки к носителю и различающихся степенью гидрофобности (адсорбенты А-Г). Структура адсорбентов приведена на схеме. Поскольку модификации по второму углеродному атому тиазольного кольца молекулы тиаминина, по которому осуществлялось присоединение лигандов к вставке, существенно не сказываются на связывании и последующем фосфорилировании тиаминина [6], можно было предположить, что полученные адсорбенты окажутся эффективными и при очистке АТР: тиаминпирозофотрансферазы (тиаминпирозофосфокиназа) — фермента, катализирующего реакцию переноса пирозофосфатной группировки от молекулы АТР на тиамин:



* Сообщение VI см. Митина В. X., Якубовская Р. И., Кляцицкий Б. А., Шемякин Ф. М. (1980) Химия природн. соед., № 4, 556-560.



Ранее тиаминпирофосфокиназа была выделена в гомогенном состоянии с низким выходом из пивных дрожжей [7], печени крыс [8], сердца свиньи [9] и листьев петрушки [10] с использованием классических методов разделения белков. Применение на последних стадиях очистки ионообменной хроматографии [7] приводило, как правило, к значительной потере тиаминпирофосфокиназной активности. Очень низкую стабильность обычно имеют аллостерические ферменты, обладающие четвертичной структурой со слабо связанными субъединицами, легко диссоциирующими и подвергающимися быстрым необратимым изменениям после диссоциации [11]. Тиаминпирофосфокиназа относится к классу регуляторных диссоциирующих ферментов [8, 12, 13]. Нарушение четвертичной структуры фермента зависит от его концентрации в растворе, pH, ионной силы раствора, влияния субстратов и эффекторов. Реассоциировать отдельные диссоциированные субъединицы нам не удалось [12].

Использование для очистки метода аффинной хроматографии приводило к хорошему выходу тиаминпирофосфокиназы мозга крыс с достаточно высокой концентрацией белка в элюате [2], однако применяемый адсорбент отличался низкой стабильностью, исключавшей возможность его многократного употребления [1].

В настоящей работе описаны методы очистки дрожжевой тиаминпирофосфокиназы, включающие в себя аффинную хроматографию на синтезированных нами [5] тиаминсодержащих биоспецифических адсорбентах. В модельных экспериментах при хроматографии на адсорбентах А-Г выяснен вклад неспецифических взаимодействий в адсорбцию фермента (схема).

Определение связывания частично очищенного препарата тиаминпирофосфокиназы проводилось на предварительно уравновешенных 20 мМ Na-цитратным (pH 4,0-5,0) или 20 мМ трис-малеатным (pH 5,2-9,0) буферными растворами колонках с адсорбентом А, содержащим в качестве

лиганда тиамин. Как показали результаты исследования, сорбции фермента в этих условиях не происходило. При этом удельная активность тиаминпирофосфокиназы, не связавшейся с адсорбентом, была постоянно более высокой, чем удельная активность белка до нанесения на колонку, что свидетельствовало о связывании сопутствующих примесей, загрязняющих препарат фермента. При электрофоретическом анализе фракций, элюированных 8 М мочевиной или 0,5% раствором додецилсульфата натрия при 60°C и обессоленных на колонке с сефадексом G-25, не было обнаружено белковых полос, соответствующих тиаминпирофосфокиназе. Введение в уравновешивающий буферный раствор аллостерических эффекторов — ионов Mg^{2+} или АМР — не способствовало связыванию фермента.

Следует отметить, что отсутствие взаимодействия иммобилизованного тиамина с ферментом подтверждает данные ряда авторов [8, 10] о строго упорядоченном присоединении субстратов и освобождении продуктов в тиаминпирофосфокиназной реакции.

В работе [2] описана очистка тиаминпирофосфокиназы мозга крыс на биоспецифическом адсорбенте с тиаминмонофосфатом в качестве лиганда. Использование для этой цели продукта киназной реакции — тиаминпирофосфата, обладающего относительно высоким сродством к выделяемому ферменту, представляется более целесообразным (константы диссоциации для тиамина моно- и тиаминпирофосфата соответственно равны $2 \cdot 10^{-4}$ и $5,5 \cdot 10^{-7}$ М [14]). Проведение аффинной хроматографии тиаминпирофосфокиназы на тиаминпирофосфатсодержащем адсорбенте Б при различных значениях рН показало (рис. 1), что наиболее эффективное связывание с адсорбентом наблюдается при нанесении белка на колонку, уравновешенную 20 мМ трис-малеатным буферным раствором, рН 7,2, с 0,5 мМ EDTA, 1 мМ $MgSO_4$ и 5 мМ меркаптоэтанолом (уравновешивающий буферный раствор). Емкость адсорбента, определенная при заведомом его насыщении тиаминпирофосфокиназой, составляла в этих условиях 0,56 мг фермента на 1 мл геля (табл. 1). Ионы Mg^{2+} , выступая в роли аллостерического активатора фермента [7], способствуют связыванию. В отсутствие последнего сорбционная емкость колонки снижалась более чем в 2,5 раза.

Для десорбции тиаминпирофосфокиназы с адсорбента Б первоначально была применена конкурентная элюция уравновешивающим буферным раствором, содержащим 20 мМ тиаминпирофосфат. Фермент при этом количественно десорбировался с колонки, однако оказался электрофоретически неоднородным. Попытки элюировать тиаминпирофосфокиназу субстратами (тиамин, Mg^{2+} -АТР) или ингибиторами (тиаминмонофосфат, АМР) в аналогичных концентрациях не приводили к количественной десорбции и элюции ферментного препарата в гомогенном состоянии.

Известно [15], что при потенциометрическом титровании растворов тиамина щелочью наблюдается раскрытие его тиазолового цикла вследствие образования тиоловой формы витамина (константа позициации pK_2 для тиамина равна 9,2). При подкислении тиоловой формы от рН 11,5 до рН 8,65 в водных растворах происходит быстрое и полное закрытие тиазолового цикла и образование нейтральной формы витамина. Показано также [6], что структурные аналоги тиамина с раскрытым тиазоловым циклом не способны контактировать с активным центром тиаминпирофосфокиназы и не фосфорилируются до соответствующих пирофосфорных эфиров.

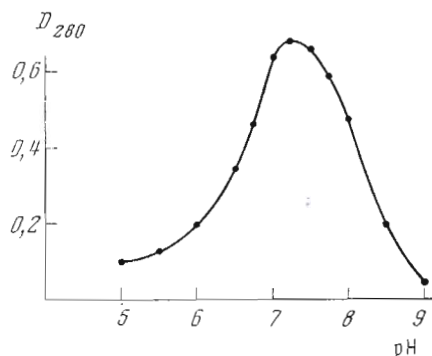


Рис. 1. Зависимость связывания дрожжевой тиаминпирофосфокиназы на адсорбенте Б от величины рН

Таблица 1

Сравнительная характеристика адсорбентов А-Г

Адсорбент	Емкость по суммарному белку *, мг/мл адсорбента	Белок, десорбируемый 1 М NaCl, % к связанному с адсорбентом	Емкость по тиаминпирозофосфокиназе **, мг/мл адсорбента	
			в отсутствие Mg ²⁺	в присутствии Mg ²⁺
А	5,67	5,3	0,00	0,00
Б	5,92	5,4	0,22	0,56
В	2,89	3,4	0,25	0,67
Г	1,13	4,7	0,00	0,00

* Белок, десорбируемый 8 М мочевиной или 0,5% раствором додецилсульфата натрия при 60° С.

** Количественно элюируется линейным градиентом рН.

Таблица 2

Очистка дрожжевой тиаминпирозофосфокиназы с использованием на конечной стадии метода аффинной хроматографии

Стадия	Общее количество белка, мг	Активность		Степень очистки	Выход, %
		общая, нмоль·ч ⁻¹	удельная, нмоль·ч ⁻¹ ·мг ⁻¹ белка		
Препарат фермента, полученный после фракционирования (NH ₄) ₂ SO ₄ [16]	64	512	8	—	100
Аффинная хроматография на адсорбенте В	0,98	456	464	58	89

Таблица 3

Очистка тиаминпирозофосфокиназы из пивных дрожжей с использованием метода аффинной хроматографии на начальной стадии

Стадия	Общее количество белка, мг	Активность		Степень очистки	Выход, %
		общая, нмоль·ч ⁻¹	удельная, нмоль·ч ⁻¹ ·мг ⁻¹ белка		
Исходный экстракт	356	142	0,4	—	100
Аффинная хроматография на адсорбенте В	0,864	124,4	144	360	87,6
Гель-фильтрация на сефадексе G-200	0,213	102	480	1200	72

Исходя из вышесказанного, следовало ожидать, что внутримолекулярная перестройка молекулы витамина при высоких значениях рН приведет к нарушению взаимодействия адсорбированного фермента с иммобилизованным лигандом и его десорбции с колонки, не сказываясь при этом на свойствах адсорбента. Действительно, при обработке адсорбента Б со связанным ферментом 20 мМ трис-малеатным буферным раствором, рН 9,0, с 0,5 мМ EDTA и 5 мМ меркаптоэтанолом происходит количественная элюция белка, обладающего тиаминпирозофосфокиназной активностью, однако полученный препарат давал несколько полос при электрофорезе в полиакриламидном геле. Заметного ухудшения сорбционных свойств адсорбента при 8—9-кратном использовании колонки не наблюдалось.

Полностью гомогенный по тесту диск-электрофореза фермент был выделен при использовании линейного градиента рН, создаваемого 20 мМ

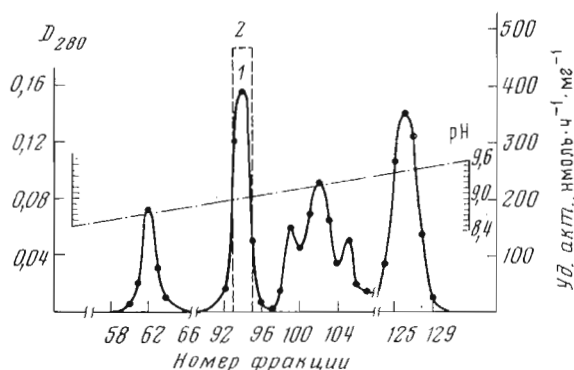


Рис. 2. Аффинная хроматография тиаминпирофосфокиназы на адсорбенте Б. Условия хроматографии приведены в тексте: 1 — поглощение; 2 — удельная активность

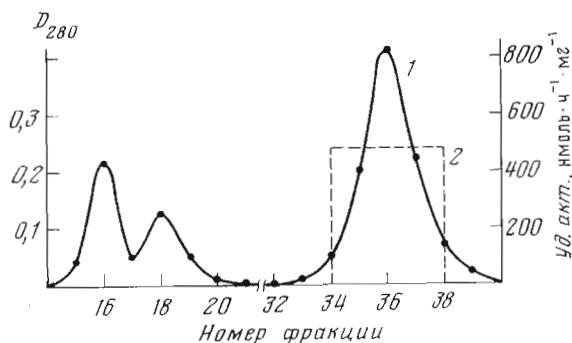


Рис. 3. Гель-фильтрация тиаминпирофосфокиназы на сефадексе G-200: 1 — поглощение; 2 — удельная активность

трис-малеатными буферными растворами, не содержащими тиаминпирофосфата. Как видно из рис. 2, при pH 8,6 (первый пик) десорбируется пируватдекарбоксилаза [5], при pH 8,9 — тиаминпирофосфокиназа и при более высоких значениях pH элюируется белок, который ранее обнаруживался при электрофорезе фракций, десорбированных с адсорбента А 8 М мочевиной или 0,5% раствором додецилсульфата натрия при 60° С.

Изучение поведения тиаминпирофосфокиназы на адсорбенте В, содержащем гидрофильную глицилглициновую вставку, показало, что фермент довольно хорошо связывался с указанным сорбентом, причем емкость по тиаминпирофосфокиназе составляла 0,67 мг/мл геля, что несколько превышает емкость адсорбента Б. Согласно табл. 1, суммарная емкость по белку адсорбента В была значительно ниже, чем для адсорбентов А или Б. При хроматографии фермента на контрольном адсорбенте Г с гидрофобной вставкой и имидазолом в качестве лиганда тиаминпирофосфокиназа не задерживалась на колонке.

Поскольку 1 М NaCl не вызывает десорбции фермента с колонки, вероятно вследствие слабых электростатических взаимодействий его с сорбентом, белок наносили на колонку без предварительного обессоливания. Снижения связывания тиаминпирофосфокиназы с аффинными адсорбентами при этом не происходило. Несущественность электростатических и гидрофобных эффектов для связывания фермента и отсутствия взаимодействия с контрольным адсорбентом Г свидетельствует о биоспецифическом характере сорбции тиаминпирофосфокиназы на адсорбентах Б и В. На биоспецифический характер связывания фермента указывает также возможность его количественной элюции с помощью высоких концентраций тиаминпирофосфата.

Результаты процесса очистки тиаминпирофосфокиназы из пивных дрожжей в оптимальных условиях на адсорбенте В приведены в табл. 2. Общий выход фермента, в расчете на частично очищенный препарат [16], составлял 89% со степенью очистки 58 раз.

Довольно часто очистка сложных по своей структуре олигомерных регуляторных ферментов требует применения особых приемов, позволяющих сохранить нативные — кинетические и аллостерические — свойства ферментов. Выделение таких ферментов из неочищенных экстрактов методом аффинной хроматографии на биоспецифических адсорбентах представляется весьма перспективным. При очистке тиаминпирофосфокиназы из автолизата пивных дрожжей на адсорбенте В (табл. 3) удельная активность фермента увеличивалась в 360 раз при выходе 87,6%. Полученный препарат помимо основной полосы, соответствующей тиаминпирофосфокиназе, давал несколько дополнительных белковых полос при электрофорезе в полиакриламидном геле. Электрофоретически гомогенный фермент был выделен при последующей гель-фильтрации белка, элюированного с адсорбента В линейным градиентом pH, на колонке с сефадексом G-200. Как видно из рис. 3, тиаминпирофосфокиназа выходила симметричным пиком с одинаковой удельной активностью во всех фракциях, содержащих фермент.

Представленные в настоящей работе результаты демонстрируют возможность очистки тиаминпирофосфокиназы различными методами, включая аффинную хроматографию на биоспецифических адсорбентах, в зависимости от целей исследования и доступности источника фермента. Кинетический анализ кривых зависимости начальной скорости реакции от концентрации аллостерического активатора, Mg^{2+} , проведенный в условиях, аналогичных описанным в работе [7], показал, что потери нативных свойств фермента в процессе его очистки не происходит.

Экспериментальная часть

В работе использовали сефадексы G-25, G-200 и сефарозу 4 В (Pharmacia Fine Chemicals, Швеция), 2-меркаптоэтанол и BrCN (Serva, ФРГ), тиамин и тиаминпирофосфат (Fluca, Швейцария), АМР и АТР (Reanal, Венгрия). Остальные реактивы — высокой чистоты («Союзреактив», СССР).

Выделение и предварительную очистку тиаминпирофосфокиназы проводили описанным ранее методом [16]. Ферментативную активность определяли по методу [17] с модификациями, описанными в работе [16]. Количество образовавшегося в тиаминпирофосфокиназной реакции тиаминпирофосфата находили при помощи апопируватдекарбоксилазы [18]. Активность рекомбинированной в течение 30 мин при 20°С и pH 6,8 холопируватдекарбоксилазы, пропорциональную содержанию тиаминпирофосфата в пробах, определяли по убыли NADH в присутствии алкогольдегидрогеназы [19]. Калибровочный график строили с хроматографически чистым препаратом тиаминпирофосфата. Белок определяли по методу Лоури [20] и спектрофотометрически по поглощению при 280 нм. Удельную активность тиаминпирофосфокиназы выражали в μ моль тиаминпирофосфата, образовавшегося за 1 ч при 40°С в расчете на 1 мг белка ферментного препарата.

Электрофорез белка (10—40 мкг) в 7,5% полиакриламидном геле выполняли по Орнштейну и Дэвису [21] при pH 8,9 в течение 1—2 ч при силе тока 2 мА на трубку в первые 20 мин, а затем 4 мА на трубку. Обнаруженные белковых полос осуществляли 0,1% раствором кумасси на 30% растворе трихлоруксусной кислоты в течение 20—30 мин. Биоспецифические адсорбенты для очистки тиаминпирофосфокиназы получали как описано в работе [5].

Хроматография тиаминпирофосфокиназы на адсорбентах А—Г (см. рис. 2). Аффинную хроматографию проводили на стеклянных колонках (0,8×10 см) при 4°С. Колонку уравнивали 20 мМ трис-малеатным

буферным раствором, рН 7,2, с 0,5 мМ EDTA, 1 мМ MgSO₄ и 5 мМ меркаптоэтанолом и наносили 356 мг дрожжевого автолизата в том же буферном растворе или частично очищенного препарата тиаминпирофосфокиназы (42 мг/мл адсорбента), полученного после фракционирования (NH₄)₂SO₄. Автолизат перед нанесением центрифугировали 1 ч при 105000 g на центрифуге VAC-601. При более высоких концентрациях вносимого белка на 1 мл геля часть тиаминпирофосфокиназы не задерживалась на колонке. Затем адсорбент промывали уравнивающим буферным раствором до отсутствия поглощения при 280 нм. Элюцию тиаминпирофосфокиназы проводили линейным градиентом рН, создаваемым 20 мМ трис-малеатными буферными растворами, рН 8,0 и 9,6, содержащими 0,5 мМ EDTA и 5 мМ меркаптоэтанол. Объем резервуара и смесителя по 250 мл. Скорость тока через колонку 15 мл/ч, объем фракций 3 мл. Фракции, проявляющие тиаминпирофосфокиназную активность, объединяли и концентрировали диализом против полиэтиленгликоля. О количественной десорбции фермента судили по выходу белка, элюированного с колонки 8 М мочевиной или 0,5% раствором додецилсульфата натрия при 60° С и разделенного методом диск-электрофореза. Для определения концентрации тиаминпирофосфокиназы в полиакриламидном геле извлеченный из трубок (0,6×10 см) гель разрезали в поперечном направлении, предварительно погрузив его в раствор детергента [22]. Отдельные фракции геля гомогенизировали, элюировали 10 мМ трис-НСl-буферным раствором, рН 8,6, и в каждой из них определяли белок [20] и удельную активность. Удаление мочевины или додецилсульфата натрия из белковых фракций осуществляли на колонке (50×1,5 см) с сефадексом G-25, уравнивающим 10 мМ трис-НСl-буферным раствором, рН 7,4. Регенерацию адсорбента для повторного использования проводили 8 М мочевиной при 4° С.

Гель-фильтрация на сефадексе G-200 (рис. 3). Скопцентрированный после аффинной хроматографии фермент наносили на колонку с сефадексом G-200 (1,6×90 см), уравнивающим 10 мМ трис-НСl-буферным раствором, рН 7,4, с 50 мМ NaCl. Элюцию белка проводили тем же буферным раствором при скорости тока через колонку 9 мл/ч. Объем фракций 2 мл. Тиаминпирофосфокиназная активность обнаруживается в третьем пике.

ЛИТЕРАТУРА

1. Matsura A., Iwashima A., Nose Y. (1974) in: Methods in Enzymology, vol. XXXIV, part B, pp. 303—304, Acad. Press, N. Y.
2. Wakabayashi Y., Iwashima A., Nose Y. (1976) Biochim. et biophys. acta, 429, 1085—1087.
3. O'Brien T. A., Schrock M. L., Russell P., Blake H. R., Gennis R. B. (1976) Biochim. et biophys. acta, 452, 13—29.
4. Visser J., Strating M., Dongen W. V. (1978) Biochim. et biophys. acta, 524, 37—44.
5. Кляцницкий Б. А., Позднев В. Ф., Митша В. X., Воскобоев А. И., Черникович И. П. (1980) Биоорган. химия, 6, 1572—1584.
6. Островский Ю. М., Черникович И. П., Воскобоев А. И., Шелленбергер А. (1977) Биоорган. химия, 3, 1083—1089.
7. Воскобоев А. И., Островский Ю. М., Черникович И. П. (1975) Биоорган. химия, 1, 1489—1497.
8. Арцукевич И. М., Воскобоев А. И., Островский Ю. М. (1977) Вопр. мед. химии, 23, 203—210.
9. Hamada M. (1969) J. Japan Biochem. Soc., 41, 837—849.
10. Mitsuda H., Takii Y., Iwami K., Yasumoto K. (1975) J. Nutr. Sci. Vitaminol., 21, 103—115.
11. Максимов В. И. (1975) Тезисы Всес. совещания «Кристаллические ферменты; методы получения, их характеристика и применение», с. 22, Вильнюс.
12. Воскобоев А. И., Островский Ю. М., Черникович И. П. (1975) Биоорган. химия, 1, 828—832.
13. Черникович И. П., Воскобоев А. И., Арцукевич И. М. (1979) Тезисы научных сообщений на IV Всес. биохим. съезде, с. 47, «Наука», Л.
14. Mitsuda H., Takii Y., Yasumoto K. (1975) J. Nutr. Sci. Vitaminol., 21, 189—198.
15. Островский Ю. М. (1975) в кн.: Активные центры и группировки в молекуле тиамина, с. 20—22, «Наука и техника», Минск.

16. Воскобоев А. И., Чернякевич И. П., Островский Ю. М. (1975) Прикл. биохимия и микробиол., 11, 230—236.
17. Mano Y. (1960) J. Biochem. (Tokio), 47, 24—30.
18. Ullrich I. (1970) in Meth. d'Enzim. Analise, 2 Aufl. (H. U. Bergmeier), p. 130, Verlag Chemie, Weinheim/Bergster.
19. Naveke R., Goedde H. W., Holzer H. (1962) Arch. Mikrobiol., 44, 93—104.
20. Lowry O. H., Rosenberg N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951) J. Biol. Chem., 193, 265—275.
21. Ornstein L., Davis B. J. (1964) Ann. N. Y. Acad. Sci., 124, 305—320.
22. Maisel J. V. (1966) Science, 151, 988.

Поступила в редакцию
20.IV.1980

После доработки
14.VII.1980

ISOLATION AND PURIFICATION OF BIOPOLYMERS BY BIOSPECIFIC AFFINITY CHROMATOGRAPHY. VII. PURIFICATION OF THIAMINE PYROPHOSPHOKINASE FROM BREWER'S YEAST BY AFFINITY-ADSORBENT CHROMATOGRAPHY

CHERNIKEVICH I. P., VOSKOBOYEV A. I., KLYASHCHITSKY B. A.

Division of Metabolic Regulation, Academy of Sciences of the Byelorussian SSR, Grcdno; Institute of Biological and Medical Chemistry, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Chromatography of thiamine pyrophosphokinase (EC 2.7.6.2) from brewer's yeast was performed on affinity absorbents containing thiamine, thiamine pyrophosphate or imidazole as ligands, distinguished by various degree of hydrophobicity and absence of a cationic charge in the site of the spacer attachment to the carrier. The hydrophobic and electrostatic interactions were established not to affect considerably the enzyme binding. The methods involving at the final or initial stages affinity chromatography on thiamine pyrophosphate — 4-azobenzoyl-glycylglycine-Sepharose, allowed to obtain electrophoretically homogeneous preparations of thiamine pyrophosphokinase 58- or 1200-fold purified in 89 or 79% overall yield.
