

УДК 577.15.013

БИОХИМИЯ

В. А. ЯКОВЛЕВ, А. А. ПОЗНАНСКАЯ, Н. К. ПРОСВЕТОВА, И. П. РУДАКОВА,
Т. А. ПОСПЕЛОВА, А. М. ЮРКЕВИЧ

О ТОРМОЖЕНИИ АКТИВНОСТИ ГЛИЦЕРОЛДЕГИДРАТАЗЫ АНАЛОГАМИ КОБАМИДНОГО КОФЕРМЕНТА

(Представлено академиком А. Е. Браунштейном 27 IV 1970)

Известно несколько ферментативных реакций диспропорционирования и изомеризации (¹), в которых принимает участие кобамидный кофермент [α -(5,6-диметилбензимидазол)-Co-5'-дезоксаденозилкобамид], ДБК, рис. 1]. К числу таких реакций относится превращение глицерина в β -оксипропионовый альдегид, катализируемое глицеролдегидратазой*

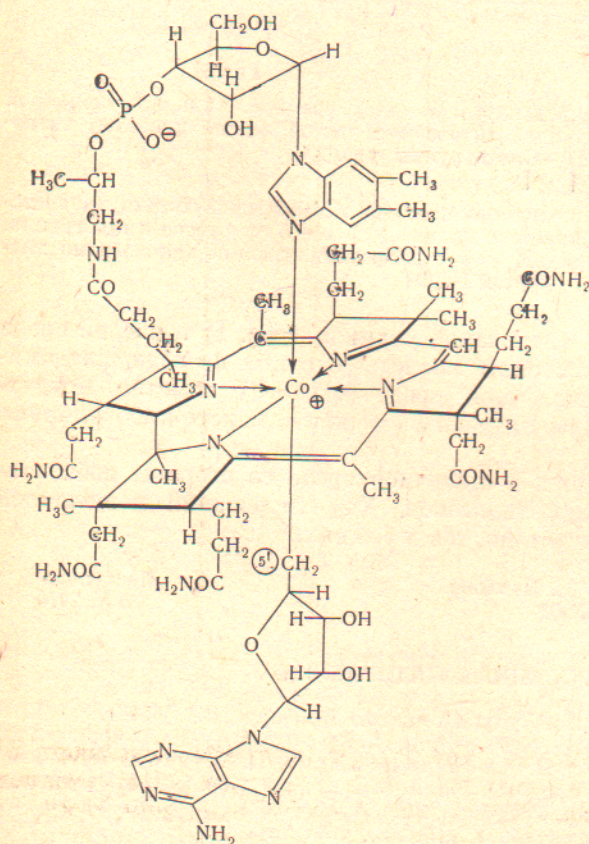


Рис. 1. Структура ДБК

Известно точной структуры нуклеозидного лиганда (5'-дезоксаденозина). Поэтому изучение аналогов ДБК, модифицированных в нуклеозидной части его молекулы, в V_{12} -зависимых реакциях представляет большой интерес.

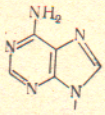
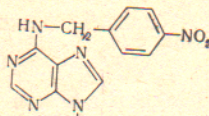
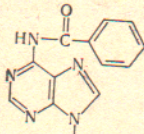
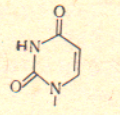
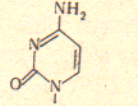
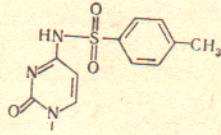
Aerobacter aerogenes (²). ДБК в глицеролдегидратазе прочно связан с апоферментом и легко удаляется адсорбцией на активированном угле. В опытах с глицерином-1-Т было найдено, что третий сначала переносится в С-5'-положение ДБК (предполагается, что при этом происходит разрыв Co—С-связи), а затем в С-2-положение β -оксипропионового альдегида — продукта реакции (³). Участие ДБК как прямого переносчика водорода от субстрата к продукту реакции было установлено и для других ДБК-зависимых реакций (^{4, 5}). Однако механизм действия ДБК мало изучен. Отсутствуют данные о взаимодействии апоферментов с ДБК, о строении активных центров V_{12} -зависимых ферментов, об их функциональных группах и т. д. Известно лишь, что для проявления коферментной активности ДБК необходимо сохране-

* Пропантриол-гидро-лиаза, (К. Ф. 4.2.1.).

Аналоги кофермента синтезированы по методу, описанному нами ранее для ДБК (*). Он заключается в получении витамина В₁₂ путем восстановления оксикобаламина боргидридом Na и последующего алкилирования В₁₂ 2',3'-фенилборными эфирами соответствующих 5'-O-(*n*-толуолсульфонил)-нуклеозидов. Синтезированы два аналога, модифицированные в адениновом ядре нуклеозида: 5'-дезоксид-[N(6) *n*-нитробензил]аденозилкобаламин (II) и 5'-дезоксид-[N(6)-бензоил]аденозилкобаламин (III) и

Таблица 1

Свойства 5'-дезоксинуклеозилкобаламинов

№№ п. п.	Строение агликона нуклеозидного лиганда	λ , м μ	$\epsilon \cdot 10^{-4}$ при рН 8,85	$E_{\text{ДБК}}$
I *		262	3,83	1,00
II		268	4,38	1,10
III		282	3,72	0,57
IV		256	3,00	0,67
V		268	2,81	1,14
VI		268 282	2,87 2,92	0,56

* I — ДБК.

три аналога, содержащих вместо пурина пиримидиновое основание: 5'-дезоксидуридил-(IV), 5'-дезоксидцитидил-(V) и 5'-дезоксид-[N(4)-*n*-толуолсульфонил]цитидилкобаламины (VI). Все соединения выделены, очищены и охарактеризованы. В табл. 1 приводятся максимумы поглощения в у.-ф. части спектра и относительная электрофоретическая подвижность ($E_{\text{ДБК}}$) в 1*N* растворе СН₃СООН при градиенте потенциала 13 в/см по отношению к подвижности ДБК, принятой за единицу. Спектры поглощения аналогов ДБК в области 300—600 м μ имеют большое сходство со спектром ДБК и при изменении рН претерпевают аналогичные изменения — гипсохромный сдвиг полосы поглощения при 525—530 м μ (рН 7,0—8,0), отнесенной к 7л—8л-переходу ('), до 460 м μ (рН 1,28). В у.-ф. части спектра положение и форма полос поглощения зависят от строения нуклеозидного лиганда, связанного с атомом Со, что может свидетель-

ствовать о существенном влиянии аксиального лиганда на хромофорную систему корринового кольца.

Частично очищенные препараты глицеролдегидратазы были выделены из бесклеточных экстрактов *A. aerogenes* штамм 572 PZN. Культуру *A. aerogenes* выращивали в течение 24—30 час. без аэрации при 30° на среде, описанной Абелесом⁽⁸⁾. Клетки отделяли от культуральной среды, отмывали 0,05 М К-фосфатным буфером pH 8,6, и суспензию клеток разрушали ультразвуком на дезинтеграторе MSE 500 вт, частота 20 кГц

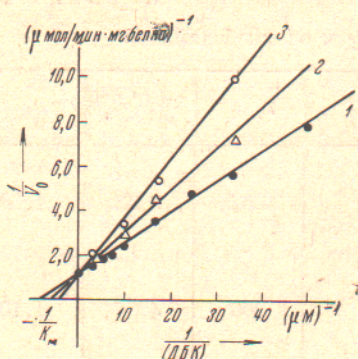


Рис. 2. Зависимость $1/v_0$ от $1/\text{ДБК}$ без аналогов и в присутствии 5'-дезоксиридилкобаламина. Объяснение в тексте

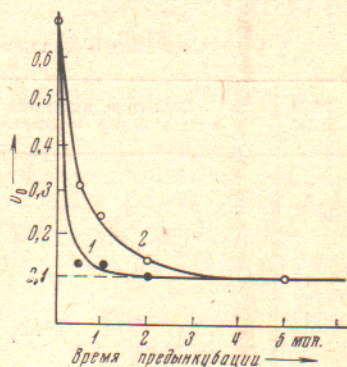


Рис. 3. Кинетика взаимодействия аналогов ДБК с апоглицеролдегидратазой. Объяснения в тексте

в течение 10 мин. с охлаждением. К суспензии добавляли активированный уголь марки «карбопол» (Польша) для удаления непрочно связанного ДБК, и после центрифугирования в течение 30 мин. при 30 000 g получали бесклеточный экстракт. Дальнейшая очистка апофермента заключалась в освобождении от нуклеиновых кислот, фракционировании $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (фракция 30—50% от полного насыщения) и гель-фильтрации через Сефадекс Г-200. Препараты апофермента были очищены указанным способом в 20—30 раз.

Для определения активности глицеролдегидратазы апофермент инкубировали в присутствии 50 μмол. глицерина и 0,02 μмол. ДБК в 0,2 М К-фосфатном буфере pH 8,0 в течение 10 мин. при 37°; общий объем 1 мл. Активность фермента определяли по количеству образовавшегося β-оксипропионового альдегида⁽⁹⁾. Для расчета начальной скорости реакции (v_0) измеряли количество образовавшегося β-оксипропионового альдегида (P) за 1; 2 и 10 мин. инкубации; v_0 рассчитывали по формуле:

$$v_0 = \Delta \frac{1}{t} / \Delta \frac{1}{P}.$$

При насыщающей концентрации глицерина (50 μмол.) константа Михаэлиса (K_M) для ДБК была рассчитана спрямлением экспериментальных данных по зависимости v_0 от концентрации ДБК в обратных координатах. На рис. 2 прямая 1 относится к ДБК; K_M , рассчитанная на основании этой прямой, равна $1,4 \cdot 10^{-7}$ М, максимальная скорость реакции $V = 0,96$ μмол/мин на 1 мг белка. Прямые 2 и 3 представляют собой зависимости v_0 от концентрации ДБК в обратных величинах в присутствии двух концентраций 5'-дезоксиридилкобаламина (0,1 и 0,2 μМ соответственно). В этих опытах аналог и ДБК добавляли в инкубационную смесь одновременно. Характер прямых указывает на конкурентный тип торможения этим аналогом: в присутствии 5'-дезоксиридилкобаламина происходит увеличение K_M для кофермента, в то время, как величина V остается неизменной. Для остальных аналогов также обнаружен конкурентный тип торможения по отношению к ДБК. Зависимость кажущейся K_M от концентрации аналога позволяет рассчитать константу ингибиро-

Таблица 2

Константы ингибирования аналогов ДБК и константы скоростей
необратимой инактивации глицеролдегидратазы

Аналоги	$K_i, 10^{-7} \text{ M}$	$k_i, \text{ мин}^{-1}$
5'-Дезоксиуридилкобаламин	2,2	1,06
5'-Девоксицитидилкобаламин	7,5	1,06
5'-Дезокси-[N(4)- <i>n</i> -толуолсульфонил]цитидилкобаламин	7,5	1,58
5'-Дезокси-[N(6)-бензоил]аденозилкобаламин	6,8	1,38
5'-Дезокси-[N(6)- <i>n</i> -нитробензил]аденозилкобаламин	4,3	>5,0

вания K_i . Из табл. 2 видно, что синтезированные аналоги обладают большим средством к апоферменту. Наибольшим средством обладает уридинный аналог ДБК, для которого $K_i = 2,2 \cdot 10^{-7} \text{ M}$, что близко к K_m для кофермента ($1,4 \cdot 10^{-7} \text{ M}$).

Для исследования кинетики взаимодействия аналогов ДБК с апоглицеролдегидратазой апофермент инкубировали с аналогом в течение различных промежутков времени, после чего к смеси добавляли субстрат и ДБК и измеряли величины v_0 . Концентрация ДБК бралась в 100-кратном избытке по отношению к аналогу ($0,5 \mu\text{M}$) для того, чтобы исключить обратимое действие аналога. Результаты этих опытов представлены на рис. 3. Кривая 1 соответствует инактивирующему действию 5'-дезоксид-[N(6)-*n*-нитробензил]аденозилкобаламина. Для остальных аналогов данные ложатся на одну кривую 2. Следовательно, все изученные аналоги вызывают необратимую инактивацию фермента, причем практически через 5 мин. предынкубации скорость реакции (которая фактически отражает концентрацию активного фермента) достигает некоторой предельной величины, одинаковой для всех аналогов. Взаимодействие фермента с аналогами, по-видимому, включает стадию обратимого образования комплекса фермент-ингибитор (EI), прочность которого определяется K_i , и стадию необратимой трансформации этого комплекса, приводящей к не-

обратимой инактивации фермента (образование EI'): $E + I \xrightleftharpoons{K_i} EI \xrightarrow{k_i} EI'$.

Кинетика необратимой инактивации, согласно предложенной схеме, описывается уравнением мономолекулярного процесса. Следовательно, снижение активности фермента во времени должно описываться экспоненциальным законом. Действительно, экспериментальные кривые описываются выражением следующего вида: $v = v_{\text{пр}} + (v_0 - v_{\text{пр}}) \cdot e^{-k_i \tau}$, где v — текущая скорость, v_0 — начальная скорость реакции и $v_{\text{пр}}$ — скорость при $\tau \rightarrow \infty$. В табл. 2 представлены величины мономолекулярных констант скоростей инактивации (k_i) глицеролдегидратазы под влиянием изученных аналогов. Константы скоростей необратимой инактивации для всех аналогов существенно не отличаются. Исключение составляет 5'-дезоксид-[N(6)-*n*-нитробензил]аденозилкобаламин, при действии которого k_i в 5 раз выше. Выяснение механизма необратимой инактивации под действием аналогов ДБК требует дальнейших исследований.

Приносим нашу глубокую благодарность Б. И. Курганову за участие в обсуждении данной работы.

Всесоюзный научно-исследовательский
витаминовый институт
Москва

Поступило
22 IV 1970

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Н. А. Barker, Biochem. J., 105, 1 (1967). ² J. Pawelkiewicz, B. Zagalak, Acta Biochim. Polon., 12, 207 (1965). ³ B. Zagalak, Bull. Acad. polon. Sci. ser. biol., 16, 67 (1968). ⁴ R. H. Abeles, P. A. Frey, Federat. Proc., 25, 1639 (1966). ⁵ J. Reteu, A. Umani-Ronchi, D. Arigoni, Experientia, 22, 72 (1966). ⁶ A. M. Юркевич, И. П. Рудакова, Т. А. Поспелова, ЖОХ, 39, 425 (1969). ⁷ G. N. Schrauzer, Naturwiss., 53, 459 (1966). ⁸ R. H. Abeles, In: Methods in Enzymology, N. Y., 9, 686 (1966). ⁹ R. Z. Smiley, M. Sobolov, Arch. Biochim. and Biophys., 97, 538 (1962).