

Н. К. НАГРАДОВА, Р. А. АСРИЯНЦ

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ «ГИДРОФОБНОЙ ПРОБЫ» —
1-АНИЛИН-8-НАФТАЛИН-СУЛЬФОНАТА
С ГЛИЦЕРАЛЬДЕГИД-3-ФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗОЙ**

(Представлено академиком С. Е. Севериным 24 VIII 1970)

Флуоресцирующие гидрофобные пробы, или соединения, претерпевающие сдвиги в одном или нескольких своих флуоресцентных свойствах в зависимости от степени полярности растворителя, могут быть использованы как индикаторы при изучении различных конформационных изменений молекулы, связанных с обнажением или экранированием ее гидрофобных областей. 1-Анилино-8-нафталин-сульфонат (АНС), резко усиливающий интенсивность флуоресценции в неполярной среде, был использован как гидрофобный метчик при изучении апомиоглобина и алгогемоглобина (1), алкогольдегидрогеназы (2), глутаматдегидрогеназы (3, 4) и других белков.

Гидрофобные участки в молекуле глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ГАФД) имеют существенное значение для поддержания ее структуры (6), однако о роли гидрофобных зон в формировании активного центра этого фермента сведений пока не имеется. Изучение влияния орто-фенаптолина на активность ГАФД различного происхождения позволило предположить, что его действие не связано с хелированием металла, а, возможно, направлено на гидрофобные области белка. В связи с этим мы допустили, что в молекуле дрожжевой и мышечной ГАФД доступность таких участков неодинакова (7). Целью настоящей работы была попытка применить АНС для выявления способности молекулы ГАФД связывать этот краситель и для характеристики состояния ее гидрофобных участков.

ГАФД из пекарских дрожжей получали по методу Кребса (8). Активность препарата составляла 10 000 мол. НАДН за 1 мин. на 140 000 г белка (0,05 М пирофосфатный буфер, $5 \cdot 10^{-3}$ М Na-арсенат, $3 \cdot 10^{-4}$ М 3-фосфоглицериновый альдегид, $5 \cdot 10^{-4}$ М НАД⁺, $5 \cdot 10^{-3}$ М ЭДТА pH 8,5, температура 25°). ГАФД из скелетных мышц кролика выделяли по методу Элоди и Сорени (9). Активность препарата составляла 13 000 мол. НАДН за 1 мин. на 140 000 г белка (условия те же, что указаны выше, но буфер 0,1 М глициновой pH 8,5). Выделение и характеристика ГАФД из скелетных мышц крысы описаны (10).

Для освобождения от связанного НАД⁺ суспензию ГАФД растворяли в $5 \cdot 10^{-3}$ М нейтральном ЭДТА до концентрации 8 мг/мл и встряхивали 30 мин. на холоду с 12 мг активированного угля «норит А» на 1 мг белка. Норит отделяли центрифугированием и раствор фермента обессоливали пропусканием через колонку с сефадексом Г-50, уравновешенную $5 \cdot 10^{-3}$ М ЭДТА pH 7,5. Обработка норитом не отражалась на активности фермента. Концентрацию белка определяли спектрофотометрически при 280 мμ (11). Концентрацию НАД⁺ определяли энзиматически. АНС использовали в виде аммонийной соли, которую получали из свободного АНС и очищали обработкой активированным углем и перекристаллизацией из горячей воды. Желто-зеленые кристаллы высушивали при комнатной температуре. Коэффициент молярной экстинкции полученного препарата составлял $5,6 \cdot 10^{-3}$ М⁻¹см⁻¹ при 350 мμ.

Спектры эмиссии флуоресценции снимали с помощью спектрофлуориметрической приставки к спектрофотометру Hitachi EPS-3, используя длину волны возбуждения 350 мμ, при $t = 25^\circ$.

Как видно из рис. 1, возбуждение при 350 мμ не вызывает заметной эмиссии флуоресценции ГАФД (кривая 1); свободный АНС обнаруживает характерное свечение с максимумом при 530 мμ, однако его интен-

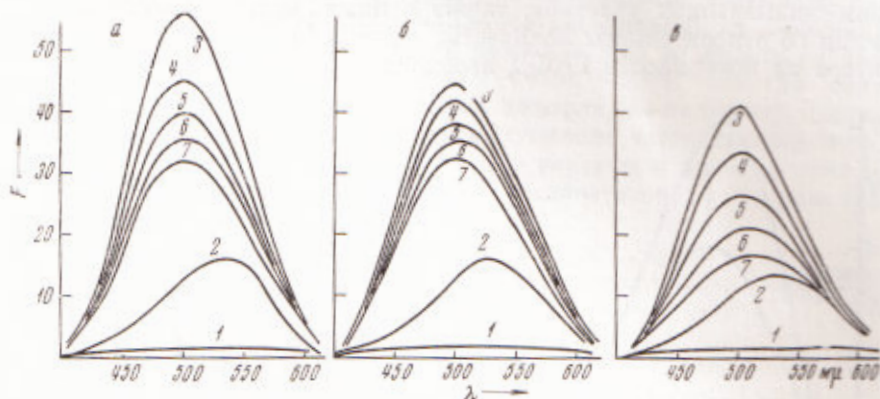


Рис. 1. Влияние NAD^+ на флуоресценцию комплекса ГАФД — АНС. а — ГАФД из скелетных мышц кролика, обработанная норитом ($A_{280}/A_{260} = 1,75$), б — ГАФД из скелетных мышц кролика до обработки норитом ($A_{280}/A_{260} = 1,15$), в — ГАФД из пекарских дрожжей после обработки норитом ($A_{280}/A_{260} = 1,87$). Проба объемом 3 мл содержала глициновый буфер 0,1 M, pH 8,5, β-меркаптоэтанол $1 \cdot 10^{-3}$ M, ЭДТА $1 \cdot 10^{-3}$ M, а также для а и б: ГАФД $4 \cdot 10^{-6}$ M (1), АНС $4,9 \cdot 10^{-5}$ M (2), ГАФД + АНС (3), для пробы 4—7 то же, что и для пробы 3, и еще NAD^+ соответственно $1,9 \cdot 10^{-5}$ M, $2,3 \cdot 10^{-4}$ M, $7,5 \cdot 10^{-4}$ M, $4,0 \cdot 10^{-3}$ M, для в: ГАФД $2 \cdot 10^{-6}$ M (1), АНС $4,9 \cdot 10^{-5}$ M (2), для пробы 3—7 — то же, что и для пробы 2, и еще NAD^+ соответственно $8,8 \cdot 10^{-5}$ M, $3,3 \cdot 10^{-4}$ M, $8,0 \cdot 10^{-4}$ M, $1,5 \cdot 10^{-3}$ M. F — интенсивность флуоресценции. Спектры флуоресценции даны без поправок на спектральную чувствительность фотоумножителя и другие искажения прибора

сивность значительно возрастает при одновременном присутствии ГАФД (кривая 3). Помимо увеличения интенсивности флуоресценции наблюдается также сдвиг ее максимума в сторону более коротких длин волн — максимум флуоресценции комплекса ГАФД с АНС приходится на 500 мμ. Как увеличение интенсивности, так и сдвиг максимума флуоресценции в фиолетовую область спектра характерны для поведения АНС в неполярных растворителях, а также для его комплексов с гидрофобными группами белков (5). Таким образом, можно полагать, что молекула ГАФД также обладает участками гидрофобной природы, доступными для связывания АНС.

Для того чтобы определить, имеют ли такие участки отношение к активному центру фермента, в частности, играют ли они роль в связывании кофактора, мы изучили взаимодействие с АНС нативного препарата ГАФД из скелетных мышц кролика, содержащего около трех частиц прочно связанного NAD^+ (имеющего отношение A_{280}/A_{260} , равное 1,15) а также того же препарата, обработанного активированным углем и освобожденного от большей части NAD^+ (A_{280}/A_{260} равно 1,75, что соответствует содержанию менее одной частицы NAD^+ на молекулу белка (11)). Из рис. 1 видно, что интенсивность флуоресценции, измеренная в строго одинаковых условиях, оказывается выше у препарата, обработанного норитом. Последовательное добавление возрастающих количеств NAD^+ приводит к гашению флуоресценции вследствие вытеснения части молекул АНС, вероятно связанных с белком в тех участках, которые вовлечены в присоединение кофактора. Как видно из рис. 1а, заметный эффект оказывает добавление $19 \cdot 10^{-6}$ M NAD^+ , т. е. менее 5 эквивалентов на моль белка (содержание

ГАФД в пробе $4 \cdot 10^{-6} M$). Это позволяет считать эффект $НАД^+$ достаточно специфичным.

Дальнейшее увеличение концентрации коэнзима вызывает дополнительное гашение флуоресценции, которое достигает при избытке $НАД^+$ определенного предела, не давая полного вытеснения АНС. Вероятно, это объясняется способностью молекулы ГАФД присоединять АНС, помимо коэнзим-связывающих участков, также в иных местах структуры. Для суждения об относительном количестве гидрофобных участков различного характера на поверхности ГАФД необходимо определение числа молекул

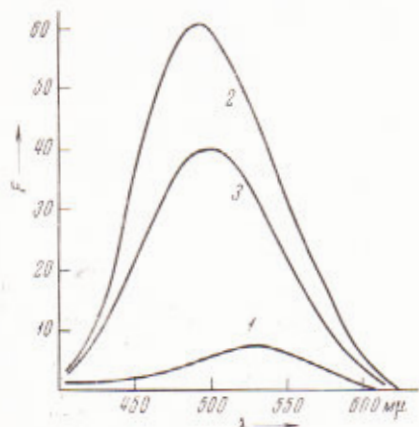


Рис. 2. Влияние частичной диссоциации ГАФД на флуоресценцию ее комплекса с АНС. Проба объемом 3 мл содержала: $0,1 M$ глициновый буфер рН 8,5, β -меркаптоэтанол $1 \cdot 10^{-3} M$, ЭДТА $1 \cdot 10^{-3} M$, а также АНС $4,9 \cdot 10^{-5} M$ (1), для пробы 2 то же, что и для пробы 1, и еще $0,42$ мг ГАФД из скелетных мышц крысы, подвергнутой частичной диссоциации на димеры путем 16-часового диализа при $+4^\circ$ против $NaCl$ $0,15 M$, ЭДТА $1 \cdot 10^{-3} M$, β -меркаптоэтанол $4 \cdot 10^{-3} M$. Остаточная активность 15%; для пробы 3 тот же препарат ГАФД после 2-часового выдерживания при $+20^\circ$. Активность восстановилась до 70%

АНС, способных связаться с одной молекулой белка, что нами намечено сделать.

Флуоресценция комплекса дрожжевой ГАФД и АНС показана на рис. 1а. Как и в случае энзима из скелетных мышц кролика, отчетливо виден эффект $НАД^+$, вытесняющего АНС из связи с белком. ГАФД из пекарских дрожжей кристаллизуется без $НАД^+$ и обладает значительно меньшим сродством к коэнзиму, чем фермент из мышц млекопитающих (8). Так, свежесделанная дрожжевая ГАФД имела в наших условиях A_{280}/A_{250} , равное 1,6 до обработки норитом. Связывание же $НАД^+$ этим белком также происходит при участии гидрофобных взаимодействий (рис. 1а). Те участки молекулы дрожжевой ГАФД, которые в отсутствие коэнзима доступны для связывания АНС, по-видимому, способны вступать во взаимодействие и с другими агентами гидрофобной природы. По сравнению с ГАФД животного происхождения, у которой значительная часть гидрофобных зон экранирована прочно связанным $НАД^+$, этот фермент может оказаться более доступным действию ингибитора такого типа, как, например, орто-фенантролин. Неодинаковая степень подверженности действию гидрофобных ингибиторов может быть связана также с состоянием аполярных зон на поверхности белка, не вовлеченных в присоединение $НАД^+$. Подобные зоны, как указано выше, имеются в молекуле обеих дегидрогеназ, хотя мы пока не располагаем их количественной характеристикой.

Количество гидрофобных участков на молекуле, доступных для связывания АНС, может быть показателем степени активности белка, так как денатурация часто приводит к обнажению дополнительного числа функциональных групп, в том числе аполярных. В отличие от подобного неспецифического эффекта, несомненный интерес представляет изменение способности связывать «гидрофобную пробу» вследствие обратимых сдвигов конформации. В частности, подобный подход может быть применен при изучении диссоциации молекулы, когда изменения четвертичной структуры не приводят к необратимой потере активности. В таком случае появление или исчезновение определенных групп может служить указанием на их важность в поддержании связи между субъединицами.

Изучая свойства ГАФД, выделенной из скелетных мышц крысы, мы обнаружили, что диализ при $+4^{\circ}$ против $0,15 M NaCl$ приводит к частичной диссоциации молекулы на димеры, которая в значительной степени может быть обратима выдерживанием при $+20^{\circ}$ (12). Имея в виду выраженное влияние температуры на сохранение тетрамерной структуры фермента, мы предположили, что существенная роль при этом принадлежит гидрофобным взаимодействиям. Проверка способности связывать АНС у препарата ГАФД, подвергнутого частичной диссоциации на димеры, и того же препарата после реассоциации показала, что во втором случае интенсивность флуоресценции комплекса белок—АНС заметно снижена (рис. 2). Таким образом, реассоциация димеров, по-видимому, сопровождается экранированием, изменением доступности части гидрофобных зон на их поверхности, что свидетельствует о вероятном участии этих зон в образовании связи между димерами и, следовательно, в сохранении нативной конформации ГАФД.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
17 VIII 1970

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ L. Stryer, *J. Mol. Biol.*, **13**, 482 (1956). ² L. Brand, J. R. Cohlke, D. S. Rao, *Biochemistry*, **6**, 3510 (1967). ³ W. Thompson, K. L. Yielding, *Arch. Biochem. and Biophys.*, **126**, 399 (1968). ⁴ G. H. Dodd, G. K. Radda, *Biochem. J.*, **114**, 407 (1969). ⁵ L. Stryer, *Science*, **162**, 526 (1968). ⁶ S. M. Constantini-des, W. C. Deal, *Federat. Proc.*, **27**, 522 (1968). ⁷ С. Е. Северин, Н. К. Наградова, *Химия и биохимия углеводов*, «Наука», 1969, стр. 263. ⁸ E. G. Krebs, *Methods in Enzymol.*, **1**, 407 (1955). ⁹ P. Elödi, E. Szörenyi, *Acta phys. hung.*, **9**, 339 (1956). ¹⁰ Н. К. Наградова, М. К. Гусева, *Биохимия*, **36**, № 3 (1971). ¹¹ J. J. M. De Vijlder, E. C. Slater, *Biochim. et biophys. acta*, **167**, 23 (1968). ¹² Н. К. Наградова, М. К. Гусева, *Биохимия*, **36**, № 4 (1971).