

Г. А. КОЧЕТОВ, Р. А. УСМАНОВ

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АПОТРАНСКЕТОЛАЗЫ С АНАЛОГАМИ ТИАМИНПИРОФОСФАТА

(Представлено академиком С. Е. Севериным 2 IV 1971)

Ранее было показано, что взаимодействие ТПФ* с апоТК вызывает усиление интенсивности положительной полосы ц.д. апоТК в области 255—300 мμ и сопровождается появлением новой, отрицательной полосы дихроизма с максимумом около 320 мμ⁽¹⁾. Появлению отрицательной полосы ц.д. соответствовали определенные изменения и в спектре поглощения ТК⁽²⁾. На основании сопоставления разностных спектров поглощения систем ТПФ — апоТК и ТПФ — триптофан был сделан вывод о том, что при образовании холоТК ТПФ взаимодействует с остатком триптофана в активном центре фермента. Характер разностных спектров обеих систем позволил отнести новую полосу поглощения к спектрам переноса заряда⁽²⁾.

Целью настоящей работы было выяснение роли различных групп кофермента в связывании его с апоТК.

Транскетолазу выделяли из пекарских дрожжей по методу Рекера и сотрудников⁽³⁾. Удельная активность препаратов фермента составляла 10 Е на 1 мг белка. Фермент обнаруживал один симметричный пик в ультрацентрифуге и был однороден при электрофорезе в полиакриламидном геле.

Условия получения апоТК описаны в работе⁽⁴⁾. Перед измерениями ц.д. препарат фермента пропускали через колонку сефадекса Г-50, уравновешенную трис-буфером рН 6,5. Измерения ц.д. проводили на дихрографе Roussel-Jouan** в кюветках с длиной светового пути 1 см при чувствительности прибора $1,5 \cdot 10^{-5}$ ед. оптической плотности. Данные по ц.д. выражали в единицах среднего молекулярного коэффициента циркулярно-дихроичного поглощения ($\Delta\epsilon$) (в расчете на 1 аминокислотный остаток). Концентрация аналогов при исследовании в области 250—300 мμ составляла $1,5\text{—}3 \cdot 10^{-5}$ мол/л; концентрация белка — $0,5\text{—}0,6 \cdot 10^{-5}$ мол/л (молекулярный вес ТК принимался равным 140 000⁽⁵⁾). Концентрация аналогов при исследовании в области 300—350 мμ составляла $1\text{—}2 \cdot 10^{-3}$ мол/л, концентрация белка $1,8\text{—}2,1 \cdot 10^{-5}$ мол/л. рН растворов аналогов кофермента доводили до значения 6,5, так же как и рН растворов ТПФ.

Концентрацию белка определяли по методу Лоури.

В нашем распоряжении имелись следующие аналоги и фрагменты ТПФ: тиамин (1), пириитиамин (2), окситиамин (3), ТМФ (4), тиазолпирофосфат (5) и пирофосфат (6). Приводим их структурные формулы, а также формулу ТПФ (8).

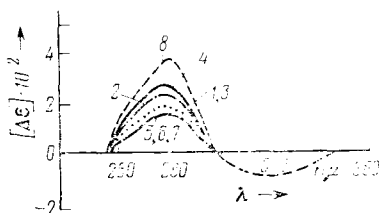
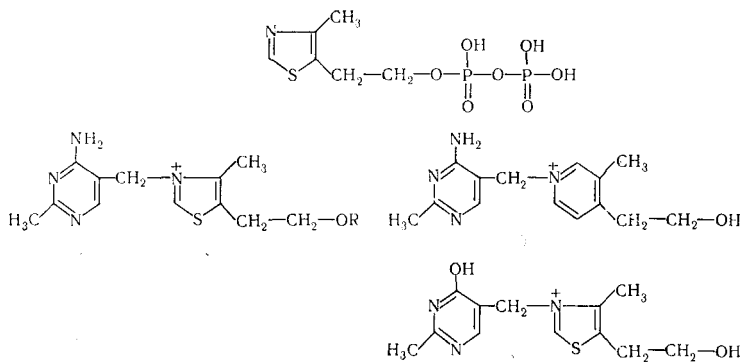


Рис. 1. Спектры ц.д. апоТК (7), холоТК (8) и систем, содержащих апоТК и один из следующих аналогов или фрагментов ТПФ: тиамин (1), пириитиамин (2), окситиамин (3), ТМФ (4), тиазолпирофосфат (5) и пирофосфат (6)

* Принятые в статье сокращения: ТПФ — тиаминпирофосфат, ТК — транскетолаза, РР — пирофосфат, ТМФ — тиаминмонофосфат, КИЗ — комплекс с переносом заряда, ц.д. — циркулярный дихроизм, о.а. — оптическая активность.

** Измерения ц.д. были выполнены в отделе физико-химических методов исследования Лаборатории биоорганической химии МГУ. Авторы благодарят сотрудников отдела за содействие в работе.



1. R = H; 4. R = H₂PO₄; 8. R = H₃P₂O₆.

Все использованные в работе аналоги могут быть подразделены на две группы: 1) с положительным зарядом (на тиазоловом кольце или пиридиновом — в случае пиритиамина), но без пирофосфатной группы (1, 2, 3, 4); 2) с пирофосфатной группой, но без положительно заряженного кольца (5).

На рис. 1 показаны спектры ц. д. различных систем, содержащих апоТК, Ca²⁺ и ТПФ (или его аналоги). Видно, что основные изменения спектра ц. д. апофермента, происходящие при добавлении ТПФ или его аналогов, сводятся к следующему. 1. Положительная полоса ц. д. в области поглощения триптофана (назовем ее для краткости триптофановой полосой) усиливается в системах, содержащих ТПФ или аналоги, не имеющие пирофосфатной группы. Следовательно, между содержанием пирофосфата и усилением триптофановой полосы нет прямой связи. Иначе говоря, аналоги, не имеющие пирофосфатного остатка, могут образовывать с белком комплекс и без участия пирофосфатного остатка. Возможно, что связывание тиаминовой части кофермента с апоТК осуществляется за счет пиридинового кольца или метильных групп, или того и другого одновременно. Пока, на основании наших данных, мы не можем сказать точно, какая из групп тиаминовой части кофермента ответственна за усиление триптофановой полосы. 2. Отрицательная полоса дихроизма, которая проявляется в области поглощения КПЗ, свойственна только холоферменту и отсутствует во всех других системах, содержащих аналог и апофермент. Это означает, следовательно, что ни один из аналогов не образует с белком КПЗ. Такой вывод коррелирует с данными, полученными в нашей лаборатории и заключающимися в том, что ни один из исследованных аналогов в комплексе с апоТК не проявляет каталитической активности. Эта корреляция позволяет предположить, что образование КПЗ является необходимым условием для формирования активного центра фермента.

Известно, что для взаимодействия триптофана с тиаминном в модельной системе необходим положительный заряд тиазолового кольца (⁶). В ферментативной системе, как можно видеть на примере тиамина и других аналогов, не содержащих пирофосфатного остатка, одного только заряда недостаточно. Необходима еще и пирофосфатная группа, как у ТПФ. Это важное отличие, характеризующее особенности образования КПЗ в активном центре фермента по сравнению с условиями образования молекулярного комплекса в модельной системе.

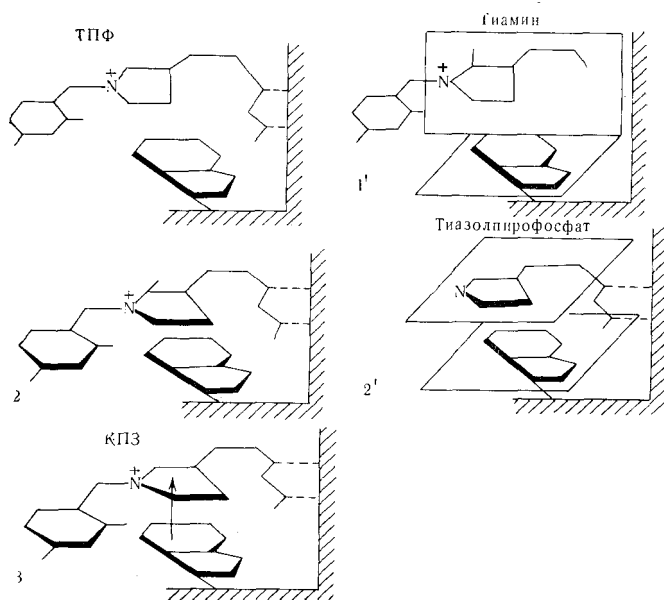
Следует сказать, что тиазолпирофосфат — аналог, содержащий пирофосфат и незаряженное тиазоловое кольцо, вообще не вызывает никаких изменений в спектре ц. д., хотя прочность комплекса, образуемого этим аналогом с апоТК, велика. Она сопоставима с прочностью комплекса ТПФ — апоТК (⁸). Известно также, что константа сродства пирофосфата к ферменту много меньше, чем константа сродства тиазолпирофосфата (⁹).

Такой же вывод следует и из наших, чисто качественных экспериментов, в которых было показано, что пирофосфат, преинкубированный с апоТК, не мешает возникновению специфического спектра ц.д. холофермента после добавления в систему ТПФ. Тиаминпирофосфат не взаимодействовал с апоферментом, если последний преинкубировали с тиазолпирофосфатом. В то же время аналоги, не содержащие пирофосфатной группы, легко вытеснялись коферментом. Отсюда следует, что даже незаряженное тиазоловое кольцо (как у тиазолпирофосфата) образует связь с апоТК.

Приведенные данные наводят на мысль, что тиазоловое кольцо при образовании комплекса с белком должно быть соответствующим образом ориентировано и что такое ориентирование возможно только в том случае, если тиазол связан с пирофосфатной группой.

Таким образом, функция пирофосфатного остатка заключается не только в том, чтобы обеспечить прочное взаимодействие кофермента с апоферментом, но и в том, чтобы соответствующим образом ориентировать тиазоловое кольцо. Поэтому можно выделить два этапа связывания ТПФ с апоТК: первый — присоединение пирофосфатного остатка кофермента и второй — ориентирование тиазолового кольца. Значение эффекта ориентирования заключается, по всей вероятности, в том, чтобы обеспечить условия, при которых становится возможным образование КПЗ. Таких условий два: во-первых, близость молекул донора и акцептора и, во-вторых, параллельность ароматических колец обоих компонентов КПЗ ⁽⁹⁾. Компонентами индолилтиаминового комплекса, как показано в работе ⁽⁶⁾, могут быть бензольное кольцо индолильной группы остатка триптофана (донор) и положительно заряженное тиазоловое кольцо кофермента (акцептор).

Последовательные и определяющие друг друга этапы образования активного центра ТК: 1) присоединение к белку пирофосфатной группы кофермента, 2) ориентирование тиазолового кольца и взаимодействие его с белком и 3) образование КПЗ. Возможное взаимодействие ТПФ и аналогов кофермента в активном центре транскетолазы приведено на схеме.



На схеме показано, что на первом этапе происходит образование промежуточного комплекса 1. На этом этапе ориентирующая функция пирофосфата еще не проявляется и мы изобразили условно, что плоскости тиазолового и бензольного колец непараллельны. В таком положении их взаимодействие с образованием КПЗ невозможно. Присоединение пирофос-

фатного остатка молекулы ТПФ к белку, несомненно, ограничивает число возможных положений молекулы кофермента относительно контактного участка; тем самым повышается вероятность того, что тиазоловое кольцо ТПФ сблизится с индолильной группой и окажется в положении, благоприятном для их взаимодействия (параллельности колец 2 и 2' на схеме).

Для образования промежуточного комплекса 2 или 2' не требуется положительного заряда тиазолового кольца. Такой комплекс, при условии близости колец и их параллельности, может стабилизироваться благодаря перекрыванию π -орбит сопряженных связей обоих колец (π -комплекс) и обеспечивать дополнительную прочность связи между этим аналогом и апоферментом по сравнению с прочностью системы РР — апоТК.

Однако роль пирофосфатной группы кофермента, по-видимому, не ограничивается ориентацией только тиазолового кольца. Рассмотрим аналог (4), тиаминмонофосфат, который содержит положительно заряженное тиазоловое кольцо и одну фосфатную группу. Известно, что эта группа принимает участие во взаимодействии данного аналога с апоферментом⁽⁸⁾. Очевидно, что фосфатная группа ТМФ способна выполнять такую же якорную функцию, как и пирофосфатная группа ТПФ. Поэтому, в соответствии со сказанным для кофермента, следовало бы ожидать, что вероятность приближения тиазолового кольца ТМФ к индолильной группе остатка триптофана с благоприятной для их взаимодействия ориентацией будет достаточно велика. Однако, образования КПЗ в системе ТМФ — апоТК, судя по отсутствию отрицательной полосы ц.д., не происходит. По-видимому, фосфатный остаток в молекуле ТМФ не обеспечивает необходимой взаимной ориентации обоих компонентов КПЗ, а в случае ТПФ такая ориентация становится возможной. Поэтому мы должны предположить, что пирофосфатная группа кофермента «осуществляет» еще одну функцию, а именно, ориентацию также и индолильной группы остатка триптофана в активном центре фермента.

Таким образом, функция пирофосфатной группы в обеспечении возможности взаимодействия ТПФ с ферментом многообразна. Пирофосфатный остаток выполняет не только роль «якоря», но и способствует взаимной ориентации обоих компонентов КПЗ в активном центре транскетолазы, что, в конечном итоге, является, по-видимому, важнейшим условием образования каталитически активной молекулы фермента.

В соответствии со сказанным относительно функции пирофосфатной группы кофермента, становится ясным, что образования КПЗ в случае аналогов, не содержащих такой группы, невозможно (1' на схеме).

И, наконец, завершающий этап 3 — образование КПЗ, для возникновения которого нужен положительный заряд тиазолового кольца. Возмущение подвижных π -электронов индолильной группы кофермента и смещение их в направлении тиазолового кольца в результате образования КПЗ оказывается, как видим, достаточным, чтобы можно было зафиксировать индуцированную зарядом асимметрию комплекса апоТК — ТПФ. Мерой этой асимметрии и является фиксируемая в спектре ц. д. холоТК отрицательная полоса в области 300—350 м μ .

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
17 III 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ G. A. Kochetov, R. A. Usmanov, V. P. Merzlov, FEBS Letters, 9, 265 (1970). ² G. A. Kochetov, R. A. Usmanov, Biochem. Biophys. Res. Commun., 41, 1134 (1970). ³ P. Srere, J. R. Cooper et al., Arch. Biochim. and Biophys., 74, 295 (1958). ⁴ Г. А. Кочетов, А. Е. Изотова, Биохимия, 35, 1023 (1970). ⁵ A. G. Datta, E. Racker, J. Biol. Chem., 236, 624 (1961). ⁶ J. E. Biaglow, J. J. Mieyal et al., J. Biol. Chem., 244, 4054 (1969). ⁷ J. J. Mieyal, J. Suchy et al., J. Biol. Chem., 244, 4063 (1969). ⁸ G. A. Kochetov, A. E. Izotova, L. E. Meshalkina, Biochem. and Biophys. Res. Commun., in press. ⁹ А. Сент-Дьери, Введение в субмолекулярную биологию, «Наука», 1964.