

А. Д. ВИНОГРАДОВ, Н. И. ЗИМАКОВА, Т. И. СОЛНЦЕВА

О МЕХАНИЗМЕ ИНГИБИРОВАНИЯ СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ОКСАЛОАЦЕТАТОМ

(Представлено академиком С. Е. Севериным 3 III 1971)

Щавелевоуксусная кислота (оксалоацетат, ОА) является мощным ингибитором сукцинатдегидрогеназы (¹⁻³). Низкое значение константы ингибирования (K_i), измеренное различными методами, позволяет рассматривать ОА как практически необратимый ингибитор (^{4,5}). Вопрос о природе связи между ингибитором и ферментом в настоящее время еще не изучен. Так как в состав активного центра сукцинатдегидрогеназы входят атомы железа и кислотолабильной среды, в литературе обсуждался механизм ингибирования, согласно которому ОА реагирует с Fe — S комплексом фермента (⁶). Однако какие-либо доказательства такого механизма отсутствуют.

В настоящей работе приведены результаты, на основании которых ОА рассматривается как структурный аналог субстрата, реагирующий с сульфгидрильной группой в активном центре сукцинатдегидрогеназы. Торможение оксалоацетатом изучали на препаратах сукцинатоксидазы Кейлина — Хартри, выделенных по методу Кинга (⁶). Сукцинатоксидазную активность регистрировали по поглощению кислорода полярографическим методом с вращающимся платиновым электродом. Сукцинатдегидрогеназу выделяли по методу Кинга (⁷). Опыты проводили с ферментом, полученным после элюции белка с Са-фосфатного геля. Активность измеряли по убыли феррицианида, регистрируемой с помощью ФЭК-56, согласованного с самопишущим потенциометром ЭПП-09-М2 (чувствительность 10 мВ, постоянная времени 1 сек.). Количество сульфгидрильных групп определяли методом амперометрического титрования с азотнокислым серебром (⁸). Оксалоацетат определяли по интенсивности окраски продукта реакции с гидразином (⁹). Растворы оксалоацетата стандартизовали по поглощению при 280 мμ, принимая коэффициент молярной экстинкции равным $3,6 \cdot 10^{-3}$ (для енольной формы) и считая, что содержание енола в водном растворе равно 20% (¹⁰). Хроматографию на бумаге проводили в течение 24 час. на холоду в смеси: уксусная кислота, бутанол, вода в объемных соотношениях (2:8:2). Хроматограммы проявляли на свободные кетогруппы — 2,4-динитрофенилгидразином, на SH-группы — нитропруссидом и на аминогруппы — нингидрином. В опытах использовали препараты щавелевоуксусной кислоты и цистеин-гидрохлорида фирмы Chemapol (Чехословакия).

При значениях рН, близких к нейтральным, ОА существует в водных растворах в виде нескольких форм: моно- и дианионов кетоформы, дианиона енола и трианиона енольной формы. Равновесие между всеми формами зависит от рН раствора (¹¹). Для выявления активной формы ингибитора, реагирующего с ферментом, мы изучили зависимость от рН скорости торможения сукцинатоксидазной активности оксалоацетатом. Так как оксалоацетат можно рассматривать как практически необратимый ингибитор, действующий по конкурентному механизму (¹²) и его концентрация в наших опытах много больше концентрации фермента, скорость торможения удобно оценивать по тангенсу угла наклона прямой, построенной

в координатах $\lg(v_0/v_t) - t$, где v_0 — скорость реакции в отсутствие ингибитора, а v_t — скорость реакции в момент времени t после добавления ингибитора.

На рис. 1 приведена серия таких кривых, полученных при различных значениях pH среды инкубации. Видно, что защелачивание среды приводит к увеличению скорости торможения. Полученные результаты исключают участие моноанионов оксалоацетата в связывании с ферментом, так как их концентрация при защелачивании сильно падает, тогда как экспериментально наблюдаемая скорость торможения в этих условиях возрастает. Зависимость скорости торможения от pH представлена на рис. 2, кривая 1. Видно, что при изменении pH среды инкубации от 6 до 8 скорость торможения увеличивается примерно в 5 раз.

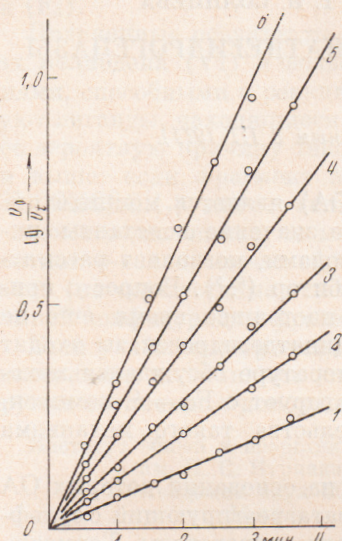


Рис. 1. Зависимость скорости ингибирования сукцинатоксидазной активности препарата Кейлина — Хартри оксалоацетатом от pH среды инкубации. 1—6 — pH 6; 6,4; 6,8; 7,2; 7,7; 8 соответственно. Условия инкубации: 0,1 M фосфатный буфер, белок 1,1 мг, сукцинат 10 ммол., цитохром С 22 ммол., оксалоацетат 50 ммол., $t = 25^\circ \text{C}$

Для того чтобы количественно оценить в какой мере увеличение торможения при защелачивании может быть обусловлено возрастанием какой-либо ионной формы ингибитора, мы рассчитали изменение концентраций дианионов кетоформы и енола, а также енолят-иона в интервале pH, указанном на рис. 2. На рис. 2, кривая 2 нанесена рассчитанная зависимость концентрации енолят-иона от pH. Видно, что при изменении pH на единицу концентрация трианиона меняется в 10 раз. При этом концентрации дианиона кетоформы и дианиона енола практически не меняются (на рисунке не показано). Однако сравнение изменений скорости торможения и концентрации енолят-иона при защелачивании среды исключает участие последнего в образовании фермент-ингибиторного комплекса (кривые 1 и 2 рис. 2). Таким образом, при выявлении активной формы ингибитора следует, по-видимому, учитывать только дианионы кето- и енольной форм оксалоацетата. При этом наиболее вероятным участником реакции с ферментом следует считать кетоформу, так как енолы кетокислот в растворе образуют циклические структуры, стабилизированные водородной связью между β -карбоксильной группой и енольным гидроксилом. Циклическая же форма не является структурным аналогом субстрата и ее участие в конкурентном торможении маловероятно.

Полученные результаты показали, что возрастание скорости торможения при защелачивании не обусловлено изменением концентрации активной формы ингибитора, а зависят от диссоциации какой-либо группы фермента. Область значений pH, при котором происходит сильное изменение скорости взаимодействия сукцинатдегидрогеназы и оксалоацетата позволила предположить участие SH-группы фермента в связывании ингибитора. Это предположение казалось тем более вероятным, что сукцинатдегидрогеназа чувствительна к реагентам на SH-группы ⁽¹²⁾.

Мы изучили торможение активности изолированного фермента параклормеркурийбензоата (*n*-ХМБ) и показали, что скорость такого торможения сильно зависит от концентрации субстрата (рис. 3): Защита фермента субстратом от тормозящего действия *n*-ХМБ, хотя и не является доказательством участия SH-группы в катализе, однако свидетельствует в пользу высказанного предположения.

На основании полученных данных была постулирована схема, соглас-

но которой α , β -активированная карбонильная группа оксалоацетата реагирует с SH-группой фермента с образованием тиополуацетальной связи. Для того чтобы проверить возможность образования тиополуацетата ОА в реакции с тиолами и сравнить параметры этой реакции с процессом ингибирования мы изучили взаимодействие в водном растворе оксалоацетата с цистеином.

С этой целью эквимольные количества цистеина и оксалоацетата инкубировали в 0,1 М фосфатном буфере рН 7,4 и смесь анализировали хро-

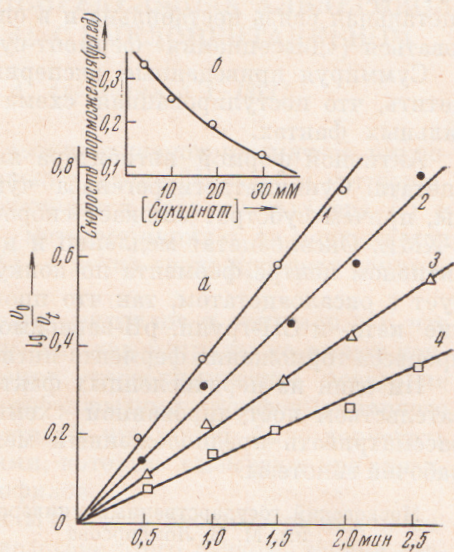
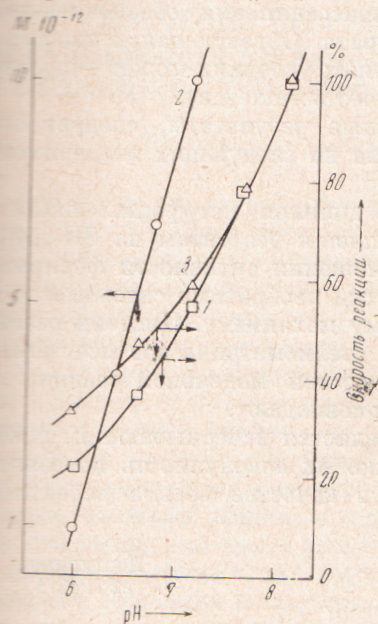


Рис. 2. Сравнение рН-зависимости изученных реакций с изменением концентрации енолат-иона. 1 — торможение сукцинатоксидазы оксалоацетатом, условия инкубации см. рис. 1; 2 — концентрация енолат-иона при общей концентрации оксалоацетата 10^{-4} М; 3 — скорость реакции цистеина с оксалоацетатом. Условия инкубации: 0,1 М фосфатный буфер, ЭДТА 5 ммол., оксалоацетат 0,1 мол., цистеин 10^{-3} мол. Убыль SH-групп определяли амперометрическим титрованием

Рис. 3. Зависимость скорости торможения сукцинатдегидрогеназной реакции *n*-ХМБ от концентрации сукцината. а — условия инкубации: 0,1 М фосфатный буфер рН 7,8; белок растворимой сукцинатдегидрогеназы 0,26 мг, *n*-ХМБ 10^{-3} мол., феррицианид $2 \cdot 10^{-3}$ мол., сукцинат 5, 10, 20, 40 ммол. (1—4, соответственно). б — зависимость тангенса угла наклона прямых 1—4 от концентрации сукцината

матографически. Оказалось, что в опытных пробах происходит исчезновение кетогрупп, выявляемых по реакции с 2,4-динитрофенилгидразином, и SH-групп, выявляемых по реакции с нитропруссидом. Наряду с этим на хроматограммах появляются новые нингидрин-положительные пятна. Эти результаты свидетельствовали в пользу образования продукта присоединения SH-группы цистеина к карбонильной группе оксалоацетата. Дальнейший анализ проводили прямым химическим определением реагентов (см. описание методов исследования). Было показано, что при смешивании оксалоацетата с цистеином в водном растворе происходит одновременное исчезновение реагентов в стехиометрическом соотношении 1:1, что подтверждает образование тиополуацетала.

Для сравнения кинетических параметров модельной реакции с процессом торможения фермента оксалоацетатом мы изучили зависимость скорости этой реакции от рН. Для этого избыток оксалоацетата инкубировали 15 мин. с цистеином при 25° С в фосфатном буфере при различных значениях рН, затем смесь охлаждали до 0° и в пробах определяли убыль

SH-групп амперометрическим титрованием. Зависимость измеренной таким образом скорости реакции от pH представлена на рис. 2 (кривая 3). Видно, что наблюдается хорошее количественное совпадение pH-зависимостей процесса торможения и модельной реакции.

Полученные результаты хорошо согласуются с постулированным механизмом взаимодействия оксалоацетата и сукцинатдегидрогеназы: диссоциация SH-группы фермента приводит к возможности нуклеофильного присоединения меркаптид-иона к α, β -активированному карбонильному углероду оксалоацетата. Высокая скорость присоединения обеспечивается структурным подобием ингибитора и субстрата. Образующаяся тиополуацетальная связь нестабильна и в определенных условиях может гидролизываться («диссоциация» фермент-субстратного комплекса).

Суммируя приведенные экспериментальные результаты, следует отметить, что постулированная схема основана на следующих экспериментальных фактах.

Активной формой ингибитора является дианион кетоформы оксалоацетата. Сукцинатдегидрогеназа чувствительна к реагентам на SH-группы, причем субстрат снижает скорость торможения активности фермента *n*-ХМБ. Оксалоацетат медленно и практически необратимо связывается в активном центре фермента по конкурентному механизму. Цистеин реагирует с оксалоацетатом, так что происходит стехиометрическое исчезновение кето- и SH-групп. pH-зависимости скоростей модельной реакции и процесса торможения фермента ингибитором совпадают.

Ни один из перечисленных фактов не является исчерпывающим доказательством постулированной схемы. Однако их совокупность позволяет рассматривать предположенный механизм в качестве весьма вероятной рабочей гипотезы.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
22 II 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ A. B. Pardee, R. Van Potter, J. Biol. Chem., 176, 1085 (1948). ² D. Keilin, T. E. King, Proc. Roy. Soc., Ser. B, 152, 163 (1960). ³ D. V. Dervartanian, C. Veeger, Biochim. et biophys. acta, 92, 233 (1964). ⁴ Н. И. Зимакова, Ю. Н. Швецов, А. Д. Виноградов, Биохимия, 35, 973 (1970). ⁵ L. Wojtczak, A. B. Wojtczak, L. Ernster, Biochim. et biophys. acta, 191, 10 (1969). ⁶ T. E. King, Methods Enzymol., 10, 202 (1967). ⁷ T. E. King, Methods Enzymol., 10, 322 (1967). ⁸ T. E. King, R. O. Morris, In: Methods Enzymol., 10, 634 (1967). ⁹ W. J. P. Neish, Methods Biochem. Anal., 5, 107 (1957). ¹⁰ R. G. Annet, G. W. Kosicki, Canad. J. Biochem., 43, 1887 (1965). ¹¹ S. S. Tate, A. K. Grzybowski, S. P. Datta, J. Chem. Soc., 1964, 1372. ¹² F. G. Hopkins, E. J. Morgan, Biochem. J., 32, 611 (1938). ¹³ W. P. Zeylemaker, A. D. M. Klaase, E. C. Slater Biochim. et biophys. acta, 191, 229 (1969).