

УДК 577.158.34

БИОХИМИЯ

И. Н. СМЕРНОВА, М. М. ЯНИНА, Н. И. МАЛЫЦЕВ, Н. К. НАГРАДОВА

**ИНГИБИРОВАНИЕ ДРОЖЖЕВОЙ
ГЛИЦЕРАЛЬДЕГИД-3-ФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ
ПРОИЗВОДНЫМИ НИКОТИНОВОЙ И ХИНОЛИНОВОЙ КИСЛОТ**

(Представлено академиком С. Е. Севериным 7 VIII 1972)

Одним из актуальных вопросов при исследовании глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ГАФД) является выяснение характера связывания коэнзима в ее активном центре. Подходом к решению этого вопроса может быть использование в качестве коэнзим-конкурентных ингибиторов различных фрагментов и аналогов НАД⁺. Изучая влияние модификаций структуры ингибитора на эффективность оказываемого им угнетения, можно получить сведения о характере возникающих взаимодействий, а также о природе и локализации отдельных участков активного центра.

Подобное направление исследования ряда НАД⁺-зависимых дегидрогеназ показало существование в коэнзимсвязывающей области активного центра алкогольдегидрогеназы, α -глицерофосфатдегидрогеназы, малатдегидрогеназы, лактатдегидрогеназы (¹⁻⁴) зоны низкой полярности, способной связывать ингибиторы гидрофобной природы. Изучение эффекта серии N'-алкилникотинамидхлоридов, показавшее усиление связывания ингибиторов по мере роста длины углеводородной цепочки их молекулы, позволило допустить близкое соседство гидрофобной зоны с участком активного центра, взаимодействующим с пиридиниевым кольцом НАД⁺ (^{1, 3, 5}). В настоящее время нами проводится работа по синтезу аналогов НАД⁺, содержащих вместо никотинамидного кольца производные хинолина. Изучая взаимодействие этих аналогов с рядом НАД⁺-зависимых дегидрогеназ, мы предполагаем получить новые сведения о структуре «пиридиниевого» участка их активных центров.

Задачей данной работы была характеристика влияния производных хинолина — гетероциклических оснований, которые можно рассматривать как структурные аналоги пиридиниевой части молекулы НАД⁺, на активность глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы. С целью выяснения зависимости прочности связывания ингибитора с белком от степени неполярности молекулы, а также ее электроно-акцепторной способности, было проведено сопоставление эффекта, оказываемого рядом производных хинолиновой и никотиновой кислот.

ГАФД выделяли из пекарских дрожжей по методу Кребса (⁶). Трижды перекристаллизованный препарат фермента был гомогенен при электрофорезе в полиакриламидном геле. В работе использовали препарат НАД⁺ фирмы «Reanal». 3-фосфоглицериновый альдегид (ФГА) получали из 1,6-фруктозодифосфата по методу Шевчук и др. (⁷). Производные пиридиниевой и хинолиновой кислот были синтезированы согласно методам, описанным в литературе (⁸⁻¹¹). Кинетические исследования проводили на анализаторе скорости реакций ЛКБ 8600 фирмы ЛКВ (Швеция) при 35°, используя шкалу 0,05 ед. оптической плотности на 20 см. Состав проб указан в подписи к рис. 1.

Никотиновая кислота, никотинамид, N'-метилникотинамид, хинолин-3-карбоновая кислота, хинолин-2,3-дикарбоновая кислота, хинолин-3-карб-

оксамид и N'-метилхинолин-3-карбоксамид, испытанные нами, оказались ингибиторами дегидрогеназной активности дрожжевой ГАДФ, конкурентными по отношению к коэнзиму. Конкурентный характер ингибирования демонстрируется рис. 1а, на котором приведены данные для хинолин-3-карбоновой кислоты, отложенные в координатах Лайнуивера — Берка. Аналогичные графики были получены для всех других ингибиторов. Величины констант ингибирования (K_i), определенные из зависимости начальной скорости реакции от концентрации ингибитора при фиксированных

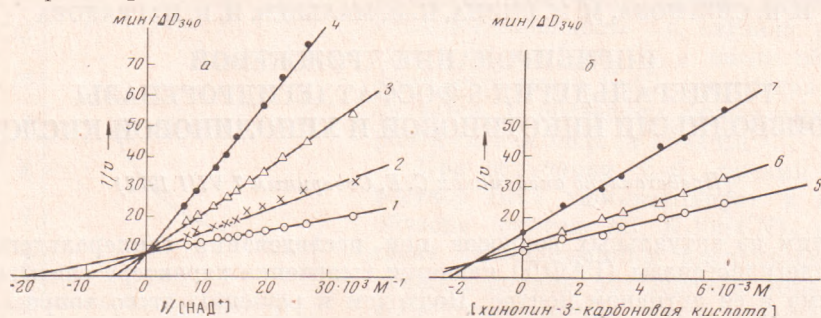


Рис. 1. Ингибирование активности ГАФД хинолин-3-карбоновой кислотой. а — метод Лайнуивера — Берка, б — метод Диксона. Состав проб: 0,4 мМ ФГА, 5 мМ ЭДТА, 10 мМ арсенат натрия, 90 мМ NaCl, 0,15—0,03 мМ НАД⁺, 0,7 мкг ГАФД, 0,2 М глициновый буфер рН 8,0. Реакцию начинали добавлением ФГА. 1 — без ингибитора; 2, 3, 4 — 2,6 мМ, 5,3 мМ и 8,0 мМ хинолин-3-карбоновая кислота соответственно; 5 — 0,09 мМ НАД⁺; 6 — 0,06 мМ НАД⁺; 7 — 0,03 мМ НАД⁺

концентрациях НАД⁺ графическим методом Диксона (¹²), приведены в табл. 1. На рис. 1б изображен график такого рода для определения K_i хинолин-3-карбоновой кислоты.

Чисто конкурентный характер ингибирования по отношению к НАД⁺ позволяет допустить, что взаимодействие изученных нами соединений с белком осуществляется в коэнзимсвязывающей области активного центра.

Таблица 1

Величины констант ингибирования дрожжевой ГАФГ производными никотиновой и хинолиновой кислот

Никотиновая кислота	$4,7 \cdot 10^{-2}$	Хинолин-2,3-дикарбоновая кислота	$3,8 \cdot 10^{-3}$
Никотинамид	$4,1 \cdot 10^{-2}$	Хинолин-3-карбоксамид	$1,8 \cdot 10^{-3}$
N'-метилникотинамид	$1,8 \cdot 10^{-2}$	N'-метилхинолин-3-карбоксамид	$4,3 \cdot 10^{-4}$
Хинолин-3-карбоновая кислота	$1,8 \cdot 10^{-3}$		

Представляется вероятным, что никотиновая кислота и ее амид присоединяются в участке, ответственном за взаимодействие с пиридиновой частью молекулы НАД⁺. В пользу этого говорит усиление связывания никотинамида при его N'-метилировании, приводящем к появлению положительного заряда на атоме азота и увеличению сходства с естественным коэнзимом.

Из табл. 1 видно, что производные никотиновой кислоты обладают значительно меньшим сродством к белку по сравнению с аналогичными производными хинолин-3-карбоновой кислоты. В связывании последних, по-видимому, определенную роль играют силы гидрофобного взаимодействия, которые не могут быть существенно ослаблены при увеличении полярности заместителя: хинолин-3-карбоновая кислота и ее амид ингибируют ГАФД практически одинаково эффективно. При введении в молекулу еще

одного полярного заместителя — отрицательно заряженной карбоксильной группы в положение 2 хинолинового кольца наблюдается ухудшение связывания. Величина K_i для хинолин-2,3-дикарбоновой кислоты вдвое больше, чем для хинолин-3-карбоновой кислоты.

Усиление связывания ингибитора по мере возрастания гидрофобности его молекулы (K_i для хинолин-3-карбоновой кислоты в 25 раз ниже, чем для никотиновой кислоты) позволяет допустить, что в активном центре ГАФД, так же как и ряда других НАД⁺-зависимых дегидрогеназ, имеется область низкой полярности, играющая роль в формировании коэнзимсвязывающего участка. Значительное увеличение эффективности ингибирования при использовании N'-метилированного производного хинолин-3-карбоновой кислоты указывает, что помимо гидрофобных взаимодействий в образовании комплекса ингибитора с белком важный вклад вносят силы электростатического характера. Вероятно поэтому, что по соседству с неполярной областью активного центра, в которой осуществляется связывание ингибиторов пиридинового и хинолинового ряда, имеется отрицательно заряженная группировка.

Следует отметить, что существование электронодонорной группы в коэнзимсвязывающей области активного центра ГАФД предполагается уже давно; эта группировка, природа которой окончательно не выяснена, участвует в образовании комплекса с переносом заряда с пиридиновым кольцом НАД⁺ (^{13,14}). N'-замещенные хинолиновые производные, как нами было показано ранее, также способны образовывать молекулярные комплексы типа переноса заряда, вступая в такого рода взаимодействия даже более легко, чем соответствующие пиридиновые производные.

Образование комплекса с переносом заряда может играть определенную роль и при взаимодействии данных ингибиторов с белком. Дальнейшее исследование природы этого взаимодействия, и в частности идентификация отрицательно заряженной группы, участвующей в присоединении ингибиторов, должно оказаться полезным для выяснения топографии коэнзимсвязывающей области активного центра ГАФД.

Всесоюзный научно-исследовательский
витаминный институт
Москва

Поступило
17 VII 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ B. M. Anderson, M. Z. Reynolds, Arch. Biochem. and Biophys., 111, 4 (1965). ² K. McCarthy, W. Lovenberg, J. Biol. Chem., 244, 3760 (1969). ³ S. J. Kim, B. M. Anderson, J. Biol. Chem., 243, 3351 (1968). ⁴ R. T. Wedding, C. Hanch, T. R. Fukuto, Arch. Biochem. and Biophys., 121, 9 (1967). ⁵ J. H. Juan, B. M. Anderson, J. Biol. Chem., 247, 515 (1972). ⁶ E. G. Krebs, In: Methods in Enzymology, 1, 1955, p. 407. ⁷ E. Szewczuk, E. Wolny et al., Acta Biochim. polon., 8, 204 (1961). ⁸ J. F. Munshi, M. M. Joullie, Tetrahedron, 24, 1923 (1968). ⁹ F. Graebe, L. Caro, Chem. Ber., 13, 99 (1880). ¹⁰ H. Mills, J. C. Watson, J. Am. Chem. Soc., 97, 741 (1910). ¹¹ P. Karrer, F. J. Stare, Helv. chim. acta, 20, 418 (1937). ¹² М. Диксон, Э. Уэбб, Ферменты, М., 1966. ¹³ L. Boross, E. Cseke, Acta biochim. biophys. Acad. sci. hung., 2, 45 (1967). ¹⁴ S. Shifrin, Biochim. et biophys. acta, 81, 205 (1964).