

УДК 577.158.34

БИОХИМИЯ

И. Н. СМИРНОВА, М. М. ЯНИНА, Н. И. МАЛЬЦЕВ, Н. К. НАГРАДОВА

ИНГИБИРОВАНИЕ ДРОЖЖЕВОЙ  
ГЛИЦЕРАЛЬДЕГИД-З-ФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ  
ПРОИЗВОДНЫМИ НИКОТИНОВОЙ И ХИНОЛИНОВОЙ КИСЛОТ

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

Одним из актуальных вопросов при исследовании глициеральдегид-З-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<sup>+</sup>. 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<sup>+</sup>-зависимых дегидрогеназ показало существование в коэнзимсвязывающей области активного центра алкогольдегидрогеназы,  $\alpha$ -глициерофосфатдегидрогеназы, малатдегидрогеназы, лактатдегидрогеназы (<sup>1-4</sup>) 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<sup>+</sup> (<sup>1, 3, 5</sup>). В настоящее время нами проводится работа по синтезу аналогов НАД<sup>+</sup>, содержащих вместо никотинамидного кольца производные хинолина. Изучая взаимодействие этих аналогов с рядом НАД<sup>+</sup>- 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<sup>+</sup>, на активность глициеральдегид-З-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 (<sup>6</sup>). Трижды перекристаллизованный препарат фермента был гомогенен при электрофорезе в полиакриламидном геле. В работе использовали препарат НАД<sup>+</sup> фирмы «Reanal». З-фосфоглицериновый альдегид (ФГА) получали из 1,6-фруктозодифосфата по методу Шевчук и др. (<sup>7</sup>). Производные никотиновой и хинолиновой кислот были синтезированы согласно методам, описанным в литературе (<sup>8-11</sup>). Кинетические исследования проводили на анализаторе скорости реакций ЛКБ 8600 фирмы LKB (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-З-карбоновая кислота, хинолин-2,3-дикарбоновая кислота, хиполин-З-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 Лайнуиера — 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

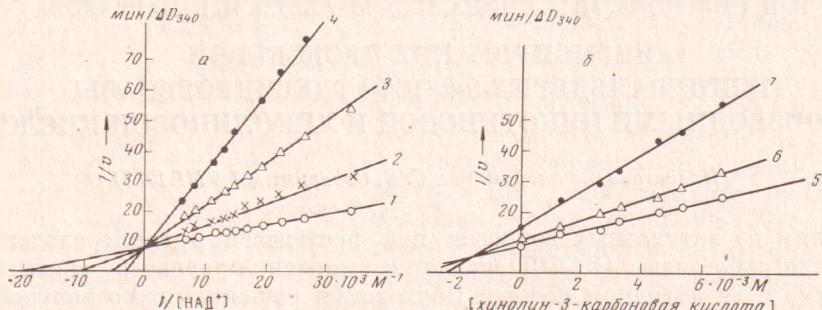


Рис. 1. Ингибирование активности ГАДФ хинолин-3-карбоновой кислотой. а — метод Лайнуиера — Берка, б — метод Диксона. Состав проб: 0,4 mM ФГА, 5 mM ЭДТА, 10 mM арсенат патрия, 90 mM NaCl, 0,15—0,03 mM НАД<sup>+</sup>, 0,7 мг ГАДФ, 0,2 M глициновый буфер pH 8,0. Реакцию начинали добавлением ФГА. 1 — без ингибитора; 2, 3, 4 — 2,6 mM, 5,3 mM и 8,0 mM хинолин-3-карбоновая кислота соответственно; 5 — 0,09 mM НАД<sup>+</sup>; 6 — 0,06 mM НАД<sup>+</sup>; 7 — 0,03 mM НАД<sup>+</sup>

концентрациях НАД<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> позволяет допустить, что взаимодействие изученных нами соединений с белком осуществляется в коэнзимсвязывающей области активного центра.

Таблица 1

Величины констант ингибирования дрожжевой ГАДФ производными никотиновой и хинолиновой кислот

Никотиновая кислота	$4,7 \cdot 10^{-2}$	Хинолин-2,3-дикарбоповая 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 пиридинической частью молекулы НАД<sup>+</sup>. 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 средством 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 ГАДФ 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<sup>+</sup>-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 образование 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, существует в образовании комплекса с переносом заряда с пиридиниевым кольцом НАД<sup>+(13, 14)</sup>. N'-замещенные хинолиновые производные, как нами было показано ранее, также способны образовать молекулярные комплексы типа переноса заряда, вступая в такого рода взаимодействия даже более легко, чем соответствующие пиридиниевые 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

- <sup>1</sup> B. M. Anderson, M. Z. Reynolds, Arch. Biochem. and Biophys., **111**, 1 (1965). <sup>2</sup> K. McCarthy, W. Lovenberg, J. Biol. Chem., **244**, 3760 (1969).  
<sup>3</sup> S. J. Kim, B. M. Anderson, J. Biol. Chem., **243**, 3351 (1968). <sup>4</sup> R. T. Wedding, C. Hanch, T. R. Fukuto, Arch. Biochem. and Biophys., **121**, 9 (1967). <sup>5</sup> J. H. Juan, B. M. Anderson, J. Biol. Chem., **247**, 515 (1972). <sup>6</sup> E. G. Krebs, In: Methods in Enzymology, **1**, 1955, p. 407. <sup>7</sup> E. Szwedzic, E. Wolny et al, Acta Biochim. polon., **8**, 201 (1961). <sup>8</sup> J. F. Munshi, M. M. Joullie, Tetrahedron, **24**, 1923 (1968). <sup>9</sup> F. Graebe, L. Caro, Chem. Ber., **13**, 99 (1880). <sup>10</sup> H. Mills, J. C. Watson, J. Am. Chem. Soc., **97**, 741 (1910). <sup>11</sup> P. Kargel, F. J. Stare, Helv. chim. acta, **20**, 418 (1937). <sup>12</sup> М. Диксон, Э. Уэбб, Ферменты, М., 1966.  
<sup>13</sup> L. Boross, E. Cseke, Acta biochim. biophys. Acad. sci. hung., **2**, 45 (1967).  
<sup>14</sup> S. Shifrin, Biochim. et biophys. acta, **81**, 205 (1964).