

АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ТРАНСФОРМАЦИИ ФЕРМЕНТОВ

М. Г. ГАЗАРЯНЦ, Ж. И. АКОПЯН

Представлены данные о трансформации ферментов. Показаны различные механизмы этого феномена на примере некоторых ферментов.

Ключевые слова: ферменты, трансформация.

В настоящее время термин «трансформация ферментов» не вызывает у энзимологов возражений, если им пользоваться в тех случаях, когда дается характеристика свойств того или иного фермента, подвергнутого воздействию (вне зависимости от его природы) модифицирующего фактора, вызывающего качественные обратимые изменения его каталитических свойств. Накопившийся за последние годы экспериментальный материал позволяет четко характеризовать трансформацию ферментов, что создает возможность обобщенного рассмотрения этих свойств у более широкого круга ферментов. По-видимому, многие исследователи, исходя из классических концепций о ферментах (трудно было представить, как может, например, оксидоредуктаза приобрести свойства трансферазы, эстеразы или фосфатазы), и не допускали возможности о подобном изменении их свойств. Однако еще в 1967 г. на седьмом Международном конгрессе в Токио Сингер с сотрудниками представили доклад под названием «Трансформация НАД·Н—дегидрогеназы в НАД·Н—коэнзим-редуктазу», где было показано, что высокоочищенные препараты НАД·Н—дегидрогеназы при контролируемом нагревании в кислой среде приобретают новое свойство—способность восстанавливать коэнзим Q.

Ксантинооксидаза (ксантин: O₂—оксидоредуктаза, КФ 1.2.3.2.) катализирует окисление ксантина до мочево́й кислоты, гипоксантина до ксантина, некоторые пурины, птерины, ряд альдегидов кислородом, феррицианидом и метиленовым синим до соответствующих карбонильных кислот. Фермент получен в высокоочищенном виде из печени цыпленка, молока. *Micrococcus lactilicus* [30], показано наличие на 1 моль фермента 2 г-атомов молибдена, 2 молей ФАД и 8 г-атомов железа [11, 29]. Фермент может находиться в активной и неактивной формах, которые могут подвергаться взаимопревращениям при помощи различных химических агентов [25]. Возможность трансформации этого фермента была продемонстрирована на примере препаратов, полу-

ченных из печени крыс в опытах при исследовании ферментативного окисления ксантина.

В этой реакции усматриваются две ферментативные активности: дегидрогеназная, при которой акцептором электронов служит НАД, и оксидазная, при которой акцептором электронов служит молекулярный кислород [29]. Только что полученный препарат фермента со значительной скоростью катализирует дегидрогенажную реакцию и очень медленно—оксидажную. Однако хранение экстрактов печени крыс в оптимальных условиях в течение 5—6 ч приводит к постепенному снижению акцептирования электронов никотинамиддинуклеотида и заметному возрастанию оксидазной активности [33]. Оказалось, что этот переход можно стабилизировать органическими растворителями, ультразвуковыми волнами и т. д. Любопытно, что сильным катализатором этой реакции служат и кусочки свежей печени крыс, что позволяет допустить участие и других ферментативных наборов в трансформации ксантиноксидазы. Стоило, однако, внести в инкубационную среду избыточную концентрацию мягкого восстановителя, как вновь наблюдалась картина, свойственная свежеприготовленным препаратам фермента, т. е. имела место обратная трансформация [15]. В настоящее время мы не располагаем прямыми экспериментальными данными, позволяющими однозначно трактовать молекулярные механизмы этого любопытного явления на примере ксантиноксидазы, ясно одно, что в эти молекулярные взаимопревращения активностей фермента вовлечены тиоловые группы, окисление и восстановление которых, по-видимому, и обуславливает дегидрогеназный или оксидазный статус фермента [15,33]. Способность катализировать реакции иного типа приобретает флавиносодержащий фермент ксантиноксидаза при отделении в определенных, щадящих условиях кофермента от апофермента. При этом он изменяет частично кинетическую характеристику ввиду частичной денатурации, однако эти изменения практически не затрагивают каталитически активную площадку, не изменяют молекулярный вес и, что очень важно, не нарушают пути передачи электронов от окисленного ксантина к акцепторам электронов [19]. Интересно, что аналогичная картина наблюдается и в случае выключения флавинового компонента от ксантиндегидрогенезы [10]. Можно также выключить флавиновый компонент из каталитического акта с помощью алкилирующих и бензилирующих реагентов [20]. Сопоставление некоторых физико-химических параметров, в частности, спектров поглощения фермента, обработанного алкилирующим реагентом, и ксантиноксидазы, у которой флавинадениндинуклеотид отделен от апофермента, показало практическое их совпадение. Эти данные, полученные при исследовании ксантиноксидазы, указывают на то важное обстоятельство, что при изучении феномена трансформации ферментов выявляются однозначные или близкие изменения каталитических свойств фермента. Важно также, что при правильном отборе субстратов можно обнаружить определенную, изменившуюся каталитическую активность апофермента.

На примере других ферментных препаратов мы продемонстрируем трансформацию каталитической активности иного типа, что еще раз подчеркивает важность адекватного набора субстратов при исследовании обратимого качественного изменения субстратной специфичности.

Липоамиддегидрогеназа (восстановленный НАД: липоамид-оксидоредуктаза, КФ 1. 6. 4. 3) катализирует окисление восстановленного липоамида (физиологическая активность), а также окисление НАД·Н за счет дихлорфенолиндофенола (диафоразная активность). Препарат фермента выделен из различных биологических объектов, однако хорошо изучен фермент, полученный из сердца свиньи [32]. Показано, в частности, что последний является димером, содержит две идентичные субъединицы, каждая из которых несет по 1 моль ФАД. Реактивом Элмана /5,5'-дितिобис-2-нитробензойная кислота/ в каждой субъединице титруется по четыре тиоловых группы. Обработка фермента 6,5 М мочевиной выявляет еще две восстановленные дисульфидные группы [32]. Обработка ферментных препаратов 2 молями дитионита полностью восстанавливает фермент, при этом происходит присоединение четырех электронов, тогда как сам флаavin может акцептировать только два электрона. Месси и сотр. открыли интересную закономерность в ферментативной активности липоамиддегидрогеназы, обработанной меркаптитидирующими реагентами парахлормеркурибензоатом или фенилмеркуриацетатом. Физиологическая активность фермента при этом снижается примерно в два раза, в то время как диафоразная активность возрастает в четыре и более раз. При выдерживании фермента на химическом столе в течение 30—60 мин происходит снижение диафоразной активности, однако обработка выдержанного фермента алкилирующим реагентом способствует почти полному восстановлению диафоразной активности [13]. Добавление в систему ионов меди в каталитических количествах и последующая инкубация в аэробных условиях приводят к значительному снижению липоамиддегидрогеназной (физиологической) активности, тогда как диафоразная активность значительно возрастает. Было высказано предположение о возможном раздельном существовании липоамиддегидрогеназы и диафоразы. Однако последующие опыты, проведенные с высокоочищенными препаратами липоамиддегидрогеназы, показали, что в данном случае речь идет о превращении липоамиддегидрогеназы в фермент с измененной субстратной специфичностью [12]. Было показано также, что после обработки фермента каталитическими количествами ионов меди содержание тиоловых групп в препаратах фермента заметно снижается. После длительного диализа и добавления ЭДТА ферментные препараты не содержат меди. Эти наблюдения свидетельствуют о том, что снижение содержания тиоловых групп в ферментных препаратах, обработанных медью, обусловлено их окислением, а не образованием меркаптидов. Добавление к окисленному медью препарату липоамиддегидрогеназы восстановителей—сульфита или цистеина—приводит к возвращению содержания тиоловых групп к исходному уровню, снижению диафоразной активности и восста-

новлению физиологической липоамиддегидрогеназной активности до уровня, свойственного нативному ферменту [27].

Способность этого фермента изменять субстратную специфичность под воздействием различных физических и химических факторов была исследована и другими авторами [36]. Показано, что изменения субстратной специфичности, очень сходные с теми, которые вызываются путем обработки медью, можно получить замораживанием и оттаиванием раствора ферментных препаратов, отделением флавинового компонента от апофермента с последующей диссоциацией апофермента на мономеры и обработкой мономера ФАД при температуре 5°, обработкой комплексобразующими реагентами. Диссоциированная на мономеры молекула фермента, как известно, обладает только диафоразной активностью [35] и отличается от димерной формы лишь небольшим изменением в структуре вблизи ФАД [27]. Это позволяет сделать вывод о том, что структура ферментного препарата, имеющего лишь диафоразную активность (мономерная форма), отличается от структуры фермента, обладающего обеими активностями (димерная форма) только в ограниченной области вокруг ФАД.

Процесс восстановления димерной формы, т. е. ассоциация голофермента, включает в себя различные конформационные формы перехода. Любопытно, что при реконструкции голофермента, т. е. сразу после присоединения кофермента, диафоразная активность резко возрастает, затем происходит медленное снижение ее при одновременном повышении липоамиддегидрогеназной активности до уровня, свойственного нативному ферментному препарату [27].

Кроме того, показано, что различные формы липоамиддегидрогеназы при одинаковой физиологической активности обладают различными диафоразными активностями в отношении классических модуляторов [31], однако трактовка этих экспериментальных данных затруднена ввиду их неоднозначности [9].

На примере трансформации липоамиддегидрогеназы мы пытались показать, как могут влиять молекулярные изменения конформации ферментного белка на ее субстратную специфичность

Глицеральдегидфосфатдегидрогеназа (Д—глицеральдегид-3-фосфат: НАД—оксидоредуктаза (фосфорилирующая), КФ 1.2.1.12) легко может быть получена в высокоочищенном виде из мышц животных различных видов, из дрожжей.

Основная реакция, катализируемая дегидрогеназой, начинается с нуклеофильной атаки атома серы тиоловой группы остатка цистеина-149, расположенного в каталитически активном центре фермента, на электрофильный атом карбонильной группы субстрата [6, 17, 24]. Эта атака завершается образованием тиополуацетала, в котором субстрат ковалентно связан с ферментом, затем основная группа фермента (возможно, ею является имидазольное кольцо остатка гистидина) способствует переносу гидрид-иона, который связан с атомом углерода карбо-

нильной группы, к углероду, находящемуся в положении 4 никотинамидного кольца НАД [7]. Молекулы дегидрогеназы, выделенной из скелетных мышц млекопитающих, состоят из четырех субъединиц с молекулярным весом по 35000 каждая [18]. В каждой субъединице содержится по одной тиоловой группе, входящей в активный центр и участвующей в образовании ацилфермента. Молекулы фермента содержат прочно связанный с белком НАД, который бесспорно участвует в катализируемой этим ферментом реакции [7, 39]. Реакция, катализируемая дегидрогеназой, представляет собой окисление 3-фосфоглицеринового альдегида в присутствии НАД⁺ и фосфата с образованием 1,3-дифосфоглицериновой кислоты [16, 22, 23].

В лаборатории Коловика было показано, что высокоочищенный препарат дегидрогеназы после обработки специфическим мягким окислителем тиоловых групп о-йодозобензоатом приобретает в определенных условиях (концентрация окислителя, рН среды, молярность и природа буфера) отсутствующую в норме фосфатазную активность, максимальная скорость которой составляет величину, примерно равную максимальной скорости реакции, катализуемой нативным ферментом [17]. Содержание тиоловых групп при этом значительно снижается. Авторы предполагают, что тиоловые группы под воздействием о-йодозобензоата окисляются до стабилизированных остатков цистеинсульфеновой кислоты. Фосфатазная активность не тормозится тиоловыми реагентами. Таким образом, фермент, катализирующий окислительную реакцию, после обработки окислителем приобретает способность к гидролитическому расщеплению ацетилфосфата [17].

Трансформация дегидрогеназы, достигаемая окислением тиоловых групп в активном центре фермента и выявляемая по ацилфосфатазной активности, обратима. Добавление к окисленному ферменту таких восстановителей, как 2-меркаптоэтанол, дитиотрейтол, аскорбиновая кислота, полностью устраняло ацилфосфатазную активность и способствовало возвращению к исходным величинам дегидрогеназной активности [39]. Были разработаны методы прямого доказательства наличия остатков сульфеновой кислоты в активном центре дегидрогеназы, обработанной окислителем в условиях, способствующих трансформации фермента, с появлением ацилфосфатазной активности. Они основаны на способности производных сульфеновых кислот реагировать с содержащими активные метиленовые группы соединениями (димедоном) с образованием тиоэфиров либо вступать в реакции присоединения по двойной связи олефинов [8, 21]. Обработка димедоном или олефином препаратов дегидрогеназы, подвергнутых действию окислителя и обладающих не обычной дегидрогеназной активностью, а лишь ацилфосфатазной, приводила к ее подавлению, причем в этих условиях дегидрогеназная активность не восстанавливалась. Установлено также, что после обработки активированным углем, удаляющим НАД из молекулы фермента, препараты фермента утрачивают дегидрогеназную активность, приобретая при этом свойственную обычно химотрипсину

способность гидролизировать паранитрофенилацетат [14]. Фосфатазная активность, появляющаяся после обработки дегидрогеназы *o*-йодозобензоатом, эстеразная активность, наблюдаемая при обработке фермента активированным углем, не идентичны активности ни одного из известных нам встречающихся в природе ферментов [14, 17].

Таким образом, нами рассмотрены примеры трансформации, когда конформационные изменения, влияющие на связи кофермента с апоферментом, приводят к существенному изменению субстратной специфичности (на примере лилоамиддегидрогеназы) или когда окислители химического происхождения приводили к качественно обратимому изменению каталитических свойств фермента (на примере триозофосфатдегидрогеназы).

Иной механизм изменения специфичности характерен для *лизинмонооксигеназы* (КФ 1.13.12.2), также относящейся к классу оксидоредуктаз. Фермент был выделен в высокоочищенном виде из бактериальной клетки, кристаллизован, изучены его каталитические, физико-химические и другие свойства. Показано, в частности, что субстратами его могут служить некоторые аминокислоты (в том числе лизин). Фермент катализирует две реакции: окислительное декарбоксилирование—оксидазная реакция фермента—и окислительное дезаминирование—оксигеназная реакция [37]. Он содержит два моля ФАД и 13 молей тиоловых групп на моль фермента, молекулярный вес порядка 190000 [34]. Блокирование восьми из тринадцати тиоловых групп приводит к трансформации оксигеназной активности в окислительную с изменением механизма реакции [3]. При оксигенировании один атом кислорода входит в молекулу субстрата, а другой восстанавливается полувосстановленным флавином до H_2O . При этом фермент приобретает новое свойство—способность катализировать окислительное дезаминирование лизина с образованием α -кетокислоты, аммиака и перекиси водорода [4]. Трансформация лизинмонооксигеназы с помощью меркаптидообразующих реагентов легко обратима: добавление к такому ферменту, например, дитиотрейтола восстанавливало каталитические свойства его, при этом способность катализировать окислительное дезаминирование лизина утрачивалась.

Диаминоксидаза [диамин: O_2 -оксидоредуктаза (дезаминирующая), КФ 1. 4. 3. 6] катализирует дезаминирование диаминов. Исследование воздействия восстановителей на ферментативные свойства высокоочищенных препаратов диаминоксидазы почек свиньи показало, что подобная обработка приводит к снижению скорости дезаминирования путресцина (типичный субстрат диаминоксидазы), одновременно фермент приобретает способность дезаминировать не только субстраты моноаминоксидазы (тирамин, триптамин), но и адениловую кислоту [1, 5]. Исследование природы и некоторых свойств аденилатдезаминазной активности, которая появлялась в наших опытах после обработки восстановителями высокоочищенных препаратов диаминоксидазы, позволило допустить, что, по всей вероятности, эта реакция осуществляется путем гидролитического расщепления субстрата [1, 2].

Стехиометрия реакции дезаминирования адениловой кислоты при ее инкубации с препаратом диаминооксидазы, обработанным сероводородом

Исследуемый показатель	нмоль/пробу
Освобождение аммиака	120 [5]
Освобождение инозиновой кислоты	101 [3]
Образование перекиси водорода	0 [5]

Пробы объемом 1,7 мл [0,2 М фосфатный буфер, рН 8,0] содержали 0,21 мг белка, очищенного в 1800 раз [удельная активность до обработки сероводородом—410 нмоль аммиака/мг белка/мин], по сравнению с исходным гомогенатом. Конечная концентрация адениловой кислоты в пробах—0,1 мМ. Длительность инкубации 60 мин. В скобках—количество опытов.

Из приведенных выше примеров трансформации ферментов явствует, что при изучении феномена трансформации необходимы высокоочищенные ферментные препараты, методы и приборы, используемые при повседневных энзимологических исследованиях. Однако расшифровка молекулярных механизмов этого фермента требует привлечения всего арсенала современных физико-химических и других методов молекулярной энзимологии.

Институт экспериментальной биологии
АН Армянской ССР

Поступило 10.VII 1980 г.

ՖԵՐՄԵՆՏՆԵՐԻ ՏՐԱՆՏՈՐՄԱՑԻԱՅԻ ԱԿՏՈՒԱԿ ԶԱՐՅԵՐԸ

Մ. Գ. ՂԱԶԱՐՅԱՆՑ, Ժ. Ի. ՀԱՇՈՐՅԱՆ

Տվյալ աշխատանքում մեջբերված տվյալները վերաբերում են ֆերմենտների տրանսֆորմացիայի հարցին:

Քսանտինօքսիդազի, լիպոամիդոզհիդրոգենազի և որոշ այլ ֆերմենտների օրինակների վրա ցույց են տրված այդ երևույթի տարբեր մեխանիզմները:

ACTUAL PROBLEMS OF ENZYME TRANSFORMATION

M. G. GAZARYANTS, Zh. I. ACOPYAN

Data on enzyme transformation are presented. Different mechanism of this phenomenon on the examples of some enzymes have been shown.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Акопян Ж. И., Горкин В. З. Успехи совр. биол., 76, 54, 1973.
2. Акопян Ж. И. Биолог. ж. Армении, 10, 49, 1977.

3. Горкин В. З. Мал. биология, 10, 717, 1976.
4. Москвитина Т. А. Успехи совр. биологии, 81, 68, 1976.
5. Akopyan Zh. I., Stesina L. N., Gorkin V. Z. FEBS Letters, 16, 349, 1971.
6. Allison W. S. and Connors M. J. Arch. Biochem. Biophys., 135, 333, 1970.
7. Allison W. W., Benitez L. V., Johnson C. L. Biochem. Biophys. Res. Commun 52, 1403, 1973.
8. Benitez L. V., Allison W. S. J. Biol. Chem., 249, 6234, 1974.
9. Brady A. H., Beychok S. J. Biol. Chem., 244, 4634, 1969.
10. Brady F. O., Rajagopalan K. V., Handler P. Flavins and flavoproteins. Baltimore, Univ. Park Press, 1971.
11. Bordas J., Bray P., Garner C., Hasnain S. S. J. Inorg. Biochem., 11, 181, 1979.
12. Casola L., Brumby P. E., Massey V. J. Biol. Chem., 241, 4977, 1966.
13. Casola L., Massey V. J. Biol. Chem., 241, 4985, 1966.
14. Colowick S. P., Eys J., Park J. H. In: Comprehensive Biochemistry M. Florkin E. Stotz, eds, 14, 1, 1969.
15. Della Corte E., Stirpe F. Biochem. J., 126, 739, 1972.
16. Eby D., Kirtley M. Arch. Biochem. Biophys., 198, 1979.
17. Ehring R., Colowick S. P. J. Biol. Chem., 244, 4589, 1969.
18. Kanchuger M. S., Leon P—M., Byers L. Biochemistry, 18, 4373, 1979.
19. Kanda M., Brady F. O., Rajagopalan K. V., Handler P. J. Biol. Chem., 247, 765-1972.
20. Komai H., Massey V. Flavins and flavoproteins. Baltimore, Univ. Park Press, 1971.
21. Kühle E. The Chemistry of the Sulfenic Acids, 116, 1973, Georg. Thieme Publ., Stuttgart, BRD.
22. Lien L. V., Keleti T. Acta biochim. et biophys. Acad. sci. hung., 14, 1, 1979.
23. Lien L. V., Keleti T. Acta biochim. et biophys. Acad. sci. hung., 14, 12, 1979.
24. Little C., O'Brien P. J. Europ. J. Biochem., 10, 533, 1969.
25. Massey V., Edmondson D. J. Biol. Chem., 245, 6595, 1970.
26. Mertz J. E., Davis R. W. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 69, 3370, 1972.
27. Mulswinkel-Voetberg H., Veeger C. Europ. J. Biochem., 33, 271, 1973.
28. Palmer G., Bray R. C., Beinert H. J. Biol. Chem., 239, 2657, 1964.
29. Putterman G. J., Shaikh B., Hallmark M., Sawyer C., Hixson C., Perini F. Anal. Biochem., 98, 1, 1980.
30. Rajagopalan K. V., Handler P. Biological oxidations. N. Y. Intersci. Publ. Co., 1968.
31. Sacurai V., Fukuyoshi V., Hamado M., Hajakava T., Kolke M. J. Biol. Chem., 245, 4453, 1970.
32. Schmidt U., Grafen R., Allland K., Goedde H. W. Advances, Enzymol., 32, 423, 1969.
33. Stirpe F., Della Corte E. J. Biol. Chem., 244, 3855, 1969.
34. Takeda H., Yamamoto S., Kojima Y., Hayaishi O. J. Biol. Chem., 244, 2935, 1969.
35. Visser J., Veeger C. Biochim. Biophys. Acta, 159, 265, 1968.
36. Visser J., Veeger C. Biochim. Biophys. Acta, 206, 244, 1970.
37. Williams C. H., Arscott L. D. Z. Naturforsch, b., 27, 1078, 1972.
38. Yamamoto S., Hirata F., Yamauchi T., Nozaki M., Hayaishi O., Hiromi K. Z. Naturforsch, 27 b, 1056, 1972.
39. You K-S., Benitez L. V., McCouachic W. A., Allison W. S. Biochim. Biophys. Acta, 384, 317, 1975.