



УДК 577.158.345

**РАСПРЕДЕЛЕНИЕ И НЕКОТОРЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ  
ТРИПТОФАНА И ТИРОЗИНА В ДРОЖЖЕВОЙ  
ПИРУВАТДЕКАРБОКСИЛАЗЕ \****Степура И. И., Островский Ю. М.**Отдел регуляции обмена веществ Академии наук ВССР, Гродно*

По гашению флуоресценции остатков триптофана дрожжевой ПДК (КФ 4.1.1.1) ионами йода в апоферментном и холоферментном белке соответственно на 40—45 и 25—30% определяется число доступных растворителю триптофановых остатков при известном числе молекул ТДФ в составе холофермента. Все тирозиповые остатки белка доступны для ионов йода. Гашение флуоресценции остатков триптофанов йодом коррелирует с падением ферментативной активности, которая почти полностью восстанавливается после диализа, что указывает на сохранение в условиях эксперимента связи белка с коферментом — ТДФ. Часть триптофановых остатков защищается от действия ионов йода пируватом ( $10^{-2}$ — $10^{-1}$  М). ТДФ защищает аминокислоты активного центра ПДК от фотоокисления в присутствии метиленового синего. Только высокие концентрации KI ( $> 100$  мг/мл) вызывают конформационные изменения в белковой молекуле, регистрируемые по изменению флуоресценции АНС. Частичное (5—10%) разрушение триптофана в ПДК при облучении ультрафиолетом ( $\lambda \geq 290$  нм) коррелирует с падением ферментативной активности.

Изучение молекулярной структуры активных центров многих ферментов показало, что в их состав, как правило, входят важные в функциональном отношении ароматические аминокислоты [1]. Для дрожжевой транскетолазы установлено наличие в активном центре имидазольных и триптофановых остатков [2, 3]. Показано, что кофермент транскетолазы, ТДФ, взаимодействует с остатком триптофана в активном центре, образуя комплекс с переносом заряда [4]. Вероятность образования таких комплексов между ТДФ и индольными структурами в отсутствие белка была доказана ранее на основании УФ-спектров и спектров ЯМР водных растворов указанных соединений [5]. Анализ аминокислотного состава дрожжевой ПДК показал высокое содержание в ней ароматических аминокислот [6], но прямых доказательств влияния этих аминокислотных остатков на образование связей с коферментом получено не было. На основании некоторых косвенных данных в той же работе высказано предположение, что триптофановые остатки принимают активное участие в переходах апо-ПДК в холофермент. Целью настоящей работы является выяснение роли ароматических аминокислот в построении активного центра дрожжевой ПДК. Для решения этого вопроса нами применен метод избиратель-

\* Принятые сокращения: ПДК — пируватдекарбоксилаза; ТДФ — тиаминдифосфат; АНС — 1-анилинонафталин-8-сульфонат магния.

ного разрушения остатков триптофана в молекуле белка без повреждения других аминокислотных остатков, а также пептидных и дисульфидных связей.

В связи с тем, что взаимодействие ТДФ с активным центром апо-ПДК (образование холофермента) можно рассматривать как процесс перехода кофермента из водной фазы на белок, то для такого взаимодействия могут иметь значение лишь те аминокислотные остатки активного центра, которые контактируют с растворителем, т. е. находятся на поверхности белковой молекулы или в крайнем случае в каких-то ее складках, или «карманах», доступных для ТДФ. Что касается доступности или недоступности остатков триптофана для кофермента, то она может быть определена экспериментально с применением любого низкомолекулярного

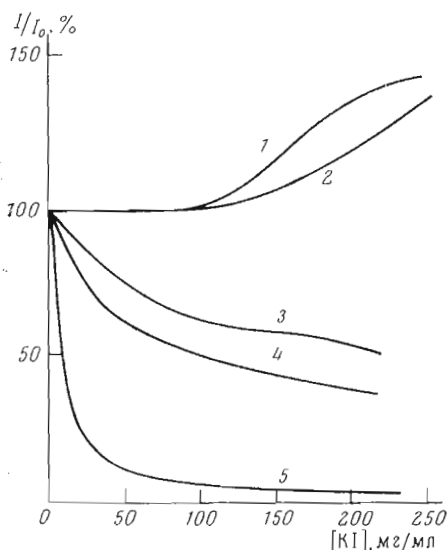


Рис. 1. Гашение флуоресценции остатков триптофана апо- и холо-ПДК (возбуждение 296 нм, флуоресценция 350 нм) и изменение флуоресценции АНС (возбуждение 360 нм, флуоресценция 490 нм) в % от исходной в зависимости от концентрации KI (мг/мл), 0,01 М фосфатный буфер (рН 6,8): 1 — флуоресценция АНС, связанного с апо-ПДК, 2 — с холо-ПДК; 3 — флуоресценция остатков триптофана холо-ПДК, 4 — апо-ПДК; 5 — флуоресценция свободного триптофана в концентрации, эквивалентной его содержанию в измеряемых концентрациях белка.  $I_0$  и  $I$  — интенсивности флуоресценции в отсутствие и в присутствии KI. Оптическая плотность  $D$  растворов для случаев 3, 4 и 5 не превышает 0,15

водорастворимого соединения, например ионов йода, которые обладают способностью гасить флуоресценцию триптофана [7]. В чистых водных растворах триптофана с концентрацией  $10^{-5}$  моль/л (рН 6,8) специфическая флуоресценция аминокислоты полностью гасится при концентрациях KI, превышающих 50 мг/мл (рис. 1, кривая 5).

В растворах дрожжевой ПДК ( $4,5 \cdot 10^{-7}$  моль/л, рН 6,8), содержащих эквивалентное количество триптофана, способность таких же концентраций ионов йода гасить флуоресценцию примерно на один порядок ниже. Более детальное изучение изменения эффекта тушения флуоресценции в зависимости от концентрации тушителя (рис. 1, кривые 3, 4) показало, что малые количества KI в присутствии белка почти также эффективны, как и при контакте со свободным триптофаном. Дальнейшее повышение концентрации тушителя примерно от 100 до 150 мг/мл практически не влияет на выход флуоресценции (рис. 1, кривая 3). Это позволяет предположить, что в белке имеются два типа триптофановых остатков: одни доступны для тушителя, так же как и триптофан в водном растворе, а другие скрыты в толще белковой молекулы.

Небольшое увеличение тушения флуоресценции остатков триптофана при дальнейшем добавлении KI ( $> 150$  мг/мл) (рис. 1, кривая 3), возможно, вызвано нарушением нативной структуры фермента в концентрированном солевом растворе, вследствие чего становятся доступными ранее скрытые остатки триптофана.

Если параллельно исследовать флуоресценцию АНС (рис. 1, кривые 1, 2) в препаратах ПДК, содержащих и не содержащих KI, то можно получить представление о суммарном количестве доступных гидрофобных

участков на белке, т. е. судить о происходящих с его молекулой конформационных процессах [8]. Присутствие КІ, как оказалось, не влияет заметно на флуоресценцию гидрофобного индикатора до тех пор, пока флуоресценция остатков триптофана эффективно тушится малыми концентрациями ионов йода. Дальнейшее добавление тушителя медленно уменьшает флуоресценцию триптофана и увеличивает флуоресценцию АНС. Следовательно, можно считать, что значение концентрации КІ  $\sim 100$  мг/мл (рис. 1, кривая 3) соответствует полному тушению всех «открытых» триптофановых остатков. Остатки триптофана, как указывалось ранее [7], определяют практически всю ультрафиолетовую флуоресценцию белков. Это верно даже в отношении белков, содержащих большое количество тирозина относительно триптофана, хотя остатки тирозина (и в меньшей степени фенилаланина) и вносят вклад в ультрафиолетовое поглощение белков. Изучение спектров поглощения показало, что тирозин имеет гораздо меньший коэффициент молярной экстинкции при 290—300 нм по сравнению с триптофаном. Поэтому спектр люминесценции белка при возбуждении светом (296 нм) можно считать спектром, обусловленным только наличием триптофана. Спектр люминесценции белка при возбуждении светом (280 нм) будет суммарным спектром люминесценции тирозиновых и триптофановых остатков [7]. Количество тирозиновых и триптофановых остатков в составе дрожжевой ПДК известно [6]. Долю флуоресценции тирозиновых остатков мы рассчитывали по методу, описанному в работе [7], а после добавления КІ в концентрации 100 мг/мл наблюдали гашение флуоресценции, измеряемое величиной, ранее найденной для доступного триптофана плюс рассчитанной для тирозина, т. е. флуоресценция тирозиновых остатков гасится практически полностью.

Косвенным подтверждением приведенных выше рассуждений о доступности всех тирозиновых остатков для растворителя могут явиться и результаты потенциометрического титрования холо-ПДК, в которой тирозин выявляется по характерному для ионизированного остатка максимуму (295 нм) при рН 9,5—11,5, т. е. в том же интервале рН, в котором происходит диссоциация свободной аминокислоты (рис. 2).

С помощью описанных выше методических подходов также сравнивали доступность для растворителя триптофановых остатков в апо- и холо-ПДК.

Как установлено ранее, флуоресценция белка, обусловленная в основном остатками триптофана, значительно уменьшается при превращении апо- в холо-ПДК [6].

Мы исследовали изменение флуоресценции остатков триптофана белка в обратном варианте опыта — при переходе холо- в апо-ПДК. В щелочной области (рН 8,0—8,5) кофермент отщепляется [6], при последующем же восстановлении активности в присутствии ионов металла требуется количество кофермента во много раз большее, чем первоначально присутствовало в нативном холоферменте. Поэтому апофермент получали при кратковременном выдерживании холофермента при рН 8,5 в фосфатном буфере, затем рН раствора доводили до 6,8. При этом почти полностью снималось экранирующее действие ТДФ (его концентрация в среде  $10^{-6}$  М) и устранялось гасящее флуоресценцию свойство ионов сульфата, вносимых обычно вместе с избытком  $MgSO_4$  в среду. При переходе холо-ПДК в апофермент флуоресценция остатков триптофана возрастала в таких условиях на 15—20%. Если к обоим белкам добавлять КІ, то начальное быстрое гашение флуоресценции у апо-ПДК также оказывается на 13—15% больше, чем у холофермента (рис. 1, кривые 3, 4). Зависимость тушения флуоресценции в случае апо-ПДК (рис. 1, кривая 4) от концентрации КІ не имеет четко выраженного плато, что свидетельствует, вероятно, о меньшей стабильности апоферментного белка. Следовательно (рис. 1, кривая 3, 4), флуоресценция доступных растворителю «открытых» триптофановых ос-

татков для апо-ПДК составляет 40—45%, а холофермента 25—30% от общей интенсивности флуоресценции этой аминокислоты в ферментном белке. Полученные процентные соотношения свидетельствуют, что эффективное тушение в обоих случаях наблюдается приблизительно при одинаковом значении интенсивности флуоресценции, определяемом скрытыми остатками триптофана. Уменьшение же триптофановой флуоресценции остатков триптофана при переходе апо- в холо-ПДК, вероятно, вызвано тушащим свойством ТДФ при связывании в активном центре, так как заметных конформационных перестроек, вызванных связыванием кофермента, обнаружено не было [6].

Полученные численные значения концентраций КI, необходимых для гашения интенсивности свечения триптофана в составе холо- и апо-фер-

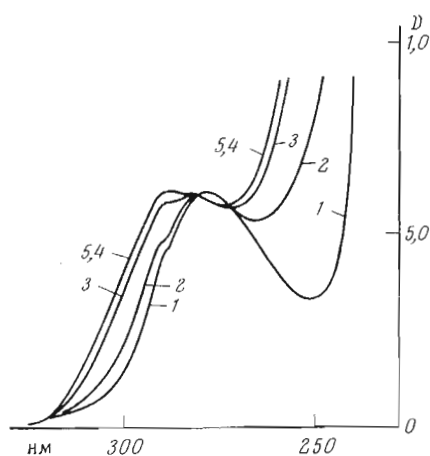


Рис. 2. Изменение спектра поглощения дрожжевой ПДК ( $C 5 \cdot 10^{-6}$  M) в зависимости от величины рН (0,01 M глициновый буфер): 1 — 6,5; 2 — 10,7; 3 — 11,4; 4 — 11,8; 5 — 12,5

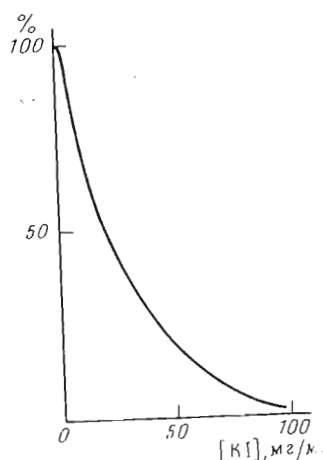


Рис. 3. Зависимость ферментативной активности дрожжевой ПДК от концентрации КI

мента непосредственно не отражают количество доступных остатков триптофана, так как известно, что квантовые выходы флуоресценции триптофана зависят также от степени подвижности и полярности окружения для этих остатков в составе белковой молекулы. Квантовые выходы флуоресценции для скрытых и открытых триптофановых остатков могут различаться, но внутри полярной и гидрофобной областей эти отличия не столь существенны.

Количество триптофановых остатков в составе дрожжевой ПДК равно 22, поэтому, зная величину уменьшения флуоресценции вследствие связывания ТДФ и количество молекул кофермента, фиксированных в активном центре (при условии, что связывание ТДФ с индолем происходит в соотношении 1 : 1 [5]), можно определить число «открытых» триптофановых остатков. В случае холо-ПДК число доступных растворителю триптофановых остатков, согласно нашим измерениям, приблизительно в 1,5 раза превышает их число в составе активного центра. Если, например, с белком связаны две молекулы ТДФ, то число открытых остатков для холо-ПДК равно 3, для апофермента — 5.

Некоторую условность в такие расчеты вносит предположение о равенстве квантовых выходов для всех «открытых» остатков триптофана, хотя они, по-видимому, действительно находятся в относительно одинаковых условиях окружения.

Добавление КI до концентраций, которые начинают выявлять «скрытые» триптофановые остатки, не уменьшает флуоресценции АНС, связан-

ной с апо- или холо-ПДК, т. е. оба реагента (КІ и АНС) не мешают друг другу, и, что особенно интересно, полная блокада с помощью КІ доступных триптофановых остатков, по-видимому, не связана с отщеплением от белка ТДФ, так как в противном случае изменилась бы флуоресценция АНС, как это было показано неоднократно [6, 9]. И только при дальнейшем (рис. 1, кривая 2) увеличении концентрации КІ наблюдается более резкое возрастание флуоресценции АНС для холо-ПДК, что, вероятно, связано с частичным отщеплением ТДФ.

Необычность рассматриваемой ситуации состоит еще и в том, что в присутствии КІ угнетается ферментативная активность (рис. 3), доходящая до нуля при блокаде всех доступных для йода остатков триптофана. Субстрат реакции — пируват конкурирует в этом случае с ионами йода. Создается впечатление, что у триптофана существует какая-то специфическая функция в ферментативной реакции, не связанная с фиксацией кофермента. Послед-

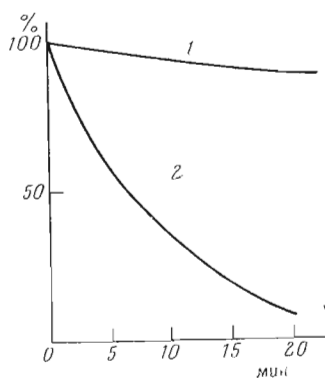


Рис. 4.

Рис. 4. Фотоинактивация ПДК (исходная активность 100%) в присутствии метиленового синего:

1 — холо-ПДК; 2 — апо-ПДК (активность измеряли путем последующего добавления избытка ТДФ и  $Mg^{2+}$ ).

Состав освещаемой пробы 0,01 М фосфатный буфер (рН 6,8); белок 0,2 мг/мл; метиленовый синий  $5 \cdot 10^{-5}$  М.

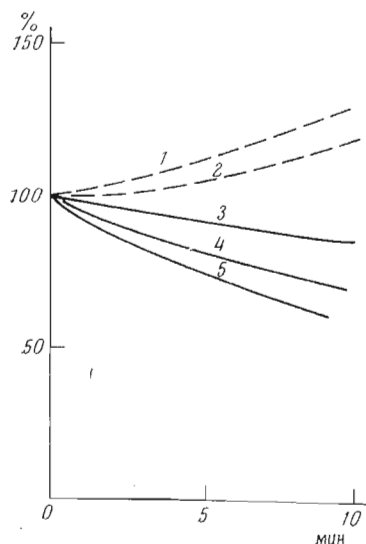


Рис. 5

Рис. 5. Флуоресценция АНС, связанного с облученным холоферментом (1), то же в присутствии добавленного ТДФ ( $2 \cdot 10^{-4}$  М) и  $Mg^{2+}$  ( $3 \cdot 10^{-3}$  М) (2), флуоресценция триптофана в составе белка (3), количество ТДФ (4), изменение активности холо-ПДК (5) в зависимости от времени облучения холо-ПДК ультрафиолетом (290 нм). По оси ординат отложены отношения измеряемых величин до и после воздействия УФ-светом

нее предположение подтверждается также опытами с удалением КІ путем диализа — активность ПДК восстанавливается при этом до 80—90%.

Если у триптофана существует какая-то специфическая функция в ферментативной реакции, не связанная только с фиксацией ТДФ, то, очевидно, потеря активности ПДК должна коррелировать с количеством поврежденных аминокислотных остатков в белке. Это предположение мы попытались проверить опытами с фотоокислением фермента в присутствии метиленового синего [2] и специфическим разрушением остатков триптофана с помощью УФ-облучения ( $\lambda \geq 290$  нм). Оказалось, что холо-ПДК мало реагировала на фотоокисление (рис. 4, кривая 1), в то время как апофермент почти полностью инактивировался (рис. 4, кривая 2). Очевидно, что ТДФ выполняет какую-то защитную функцию в этом плане, но связать ее только с судьбой триптофана трудно, так как в процессе

фотоокисления могут повреждаться и другие группировки [2]. Флуоресценция остатков триптофана в апо-ПДК, окисленном метиленовым синим, который затем удалялся диализом против воды или фосфатного буфера, изменялась незначительно, хотя фермент был полностью инактивирован, и можно считать поэтому, что триптофан не является самым чувствительным аминокислотным остатком в реакции фотоокисления, т. е. инактивация фермента вызвана превращением в первую очередь какой-то другой функциональной группировки. Если принять, что УФ-излучение в равной степени затрагивает ароматические аминокислоты независимо от характера их размещения в белковой молекуле, то степень падения флуоресценции остатков триптофана ПДК можно считать одновременно и мерой фоторазрушения остатков этой аминокислоты в активном центре фермента. После облучения при  $\geq 290$  нм флуоресценция белка постепенно падает (рис. 5, кривая 3), хотя вначале практически не изменяется УФ-спектр фермента. После падения флуоресценции на 25—30% происходит быстрая денатурация белка с резким изменением характера его УФ-спектра. Снижающаяся с самого начала опыта активность ПДК (рис. 5, кривая 5) к этому моменту полностью исчезает. При УФ-облучении происходит также некоторое разрушение ТДФ в составе фермента (рис. 5, кривая 4), в связи с чем искусственное добавление кофермента в среду частично восстанавливает активность фермента. Остаточная потеря активности ПДК почти полностью соответствует (в относительных величинах) степени инактивации остатков триптофана и убыли ТДФ в первые минуты облучения, когда еще не наблюдаются денатурационные изменения. Отщепление от белка разрушенного ТДФ (частичное образование апофермента) регистрируется по возрастанию флуоресценции АНС (рис. 5, кривая 1), так как последняя отчетливо различается в обеих формах белка [6]. После добавления ТДФ (рис. 5, кривая 2) интенсивность флуоресценции гидрофобного индикатора частично возвращается к исходному значению, что служит доказательством неизменности третичной структуры белка.

Все полученные данные говорят о наличии в активном центре дрожжевой ПДК функционально важных триптофановых остатков. Можно предположить также, что с триптофаном в активном центре связана не только фиксация кофермента, но и какие-то другие каталитические функции. Флуоресценция в ферменте остатков триптофана (доступных для растворителя), гасящаяся ионами йода без изменения нативной структуры, соответствует 25—30% в холо-ПДК и 40—45% в апо-ПДК от общей флуоресценции всех триптофановых остатков. Остальное свечение обусловлено остатками триптофана, по-видимому, размещенными в гидрофобном ядре молекулы белка. В отличие от триптофана все остатки тирозина находятся на участках фермента, непосредственно контактирующих с растворителем. Кофермент ПДК ТДФ отчетливо защищает аминокислоты активного центра фермента от фотоокисления в присутствии метиленового синего, а пируват конкурирует с ионами йода, гасящими флуоресценцию доступных растворителю триптофановых остатков.

### Экспериментальная часть

Дрожжевую ПДК (КФ 4.1.1.1) получали из пивных дрожжей с последующей очисткой на сефадексе G-200 [6]. Избирательное разрушение индольных колец триптофана достигали облучением растворов дрожжевой ПДК ( $\lambda \geq 290$  нм, лампа СВД-120А с использованием стеклянного светофильтра) в условиях, когда другие ароматические аминокислоты не подвергаются возбуждению [7]. Фотоокисление метиленовым синим проводили путем облучения видимым светом [10]. Растворы апо- или холо-ПДК [6] с удельной активностью 30—40 ед. (число микромолей пирувата, расщепляемых 1 мг ПДК за 1 мин) и конечной концентрацией белка 0,05—

0,15 мг/мл облучали в обоих случаях в стеклянной кювете при +16—+20° в течение различных промежутков времени. Все измерения проводили в 0,01 М фосфатном буфере (рН 6,8). Флуоресценцию остатков триптофана (возбуждение 296 нм) и суммарную флуоресценцию триптофана и тирозина (возбуждение при 280 нм) измеряли на спектрофлуориметре «Aminco-Bowman» (США). УФ-спектры снимали на двухлучевом регистрирующем спектрофотометре «Perkin-Elmer» 402 (Швеция). В качестве тушителей флуоресценции триптофана использовали соли KI [7].

Контроль за третичной структурой фермента осуществляли по флуоресценции магниевой соли анилинафталин-8-сульфо кислоты («Serva», ФРГ), реагента, характеризующего качественно и количественно гидрофобность белковых молекул [8]. Активность ПДК определяли спектрофотометрически по убыли пирувата в ходе реакции [11]. Количество ТДФ находили по флуоресценции тиохромфосфатов (возбуждение 370 нм, флуоресценция 350 нм) в водно-спиртовых растворах [6]. Мерой интенсивности свечения служила площадь пика под кривой флуоресценции.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Берихард С. (1971) Структура и функция ферментов, «Мир», М.
2. Кобылянская К. Р., Кочетов Г. А. (1971) Успехи биол. химии, 12, 97—118.
3. Усманов Р. А. (1970) Изучение структуры транскетолазы методом дисперсии оптического вращения и циркулярного дихроизма, Автореферат канд. дисс., МГУ, М.
4. Усманов Р. А., Кочетов Г. А. (1972) Материалы 2-го Симпозиума по тиамину, Гродно, 123.
5. Mielay J. J., Suchy J., Bialow J. E., Sable H. Z. (1969) J. Biol. Chem. 244, 4063—4071.
6. Ullrich J. (1969) Habitalisationsschrift, Universität Freiburg.
7. Владимиров Ю. А. (1965) Фотохимия и люминесценция белков, МГУ, М.
8. Mc. Clure W. O., Edelman G. M. (1966) Biochemistry, 5, 1908—1918.
9. Островский Ю. М., Ульрих И., Хольцер Х. (1971) Биохимия, 36, 739—746.
10. Кочетов Г. А., Кобылянская К. Р., (1970) Биохимия, 35, 3—11.
11. Островский Ю. М., Ульрих И., Хольцер Х. (1971) Докл. АН БССР, 15, 848—850.

Поступила в редакцию \*  
8.VII.1974

#### DISTRIBUTION AND SOME PROPERTIES OF TRYPTOPHAN AND TYROSINE RESIDUES IN YEAST PYRUVATE DECARBOXYLASE

STEPURO I. I., OSTROVSKY Yu. M.

*Metabolism Regulation Division,  
Academy of Sciences of the BSSR, Grodno*

The number of exposed Trp residues in yeast pyruvate decarboxylase (PDC) has been determined by measuring iodide quenching of tryptophan fluorescence with apo and holoenzyme (the number of TDP molecules in holoenzyme being known). The quenching correlates with the decrease in enzyme activity, which is nearly completely restored after dialysis. These results indicate that the binding between the protein and coenzyme is preserved. All the tyrosine residues were shown to be exposed. Some of the Trp residues are protected from iodide action by presence of pyruvate ( $10^{-2}$ – $10^{-4}$ M). TDP exerts the protecting effect for the active site of PDC against photooxidation with methylene blue. At high level of KI (>100 mg/ml) a conformational rearrangement occurs in the protein as evidenced by the change in ANS fluorescence. On UV-irradiation, partial destruction (5–10%) of Trp was observed which is parallel to the inactivation of PDC.

\* Статья из портфеля редакции журнала «Биохимия»; дата поступления — 2.VII.1974 г.