



УДК 577.152.276*2.042:535.370

© 1992 г. *И. П. Черникевич, А. А. Маскевич*, Г. А. Гачко*,
И. Б. Заводник, Л. Н. Гивач*, С. А. Маскевич*,
Н. Л. Коротаева**

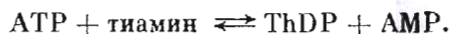
ВЛИЯНИЕ СУБСТРАТОВ, КОФАКТОРОВ И ЭФФЕКТОРОВ НА СТРУКТУРУ И ДИНАМИКУ ТИАМИНКИНАЗЫ ИЗ ПИВНЫХ ДРОЖЖЕЙ

Институт биохимии АН Беларуси, Гродно;

** Гродненский государственный университет им. Я. Купалы, Гродно*

С использованием собственной флуоресценции, а также флуоресцентных метки (пиридоксаль-5'-фосфат) и зондов (1-анилино-8-нафталинсульфонат и 2-толуидинил-6-нафталинсульфонат) изучено влияние субстратов (тиамин, Mg-АТР), кофакторов (Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+}) и эффекторов (фосфорные эфиры тиамин, пируват, фосфоенолпируват, этиловый эфир пирувата) на структуру и динамику тиаминкиназы (КФ 2.7.6.2) из пивных дрожжей. Показано, что связывание лигандов с тиаминкиназой сопровождается тушением ее триптофановой флуоресценции, заметным изменением интенсивности, длительности и смещением спектров излучения флуорофоров. Анализ полученных результатов позволил установить, что тиамин и АТР связываются соответственно пиримидиновым и адениновым циклами в гидрофобной области молекулы фермента. Пируват имеет два центра связывания: ингибирующий (относительно гидрофобный) и активирующий (гидрофильный). Последний находится в непосредственной близости с центром связывания тиамин и обеспечивает взаимодействие карбонильной группы пирувата с субстратом. Ионы двухвалентных металлов увеличивают сродство субстратов и эффекторов к белку, способствуя одновременно повышению гидрофобности его активного центра. На основании полученных данных предложена модель организации каталитического центра тиаминкиназы.

Дефицит тиамин различной этиологии сопровождается многообразными биохимическими сдвигами, свидетельствующими о серьезных нарушениях клеточного метаболизма. Временная последовательность развития событий, их причинная обусловленность и взаимосвязь происходящих при этом изменений остаются еще полностью не расшифрованными [1]. Молекулярной основой обменных нарушений, наблюдаемых при развитии недостаточности витамина B_1 , считается снижение концентрации тиаминдифосфата — кофермента немногочисленных, но занимающих ключевое положение в метаболизме клетки тиаминдифосфатзависимых ферментов [2]. Биосинтез коферментной формы тиамин осуществляется тиаминкиназой, катализирующей двухсубстратную реакцию переноса пирофосфатной группировки от молекулы АТР на тиамин:



К настоящему времени фермент выделен в высокоочищенном состоянии из печени крысы [3], мозга свиньи [4], листьев петрушки [5], пивных

Принятые сокращения: Th — тиамин, ThMP — тиаминмонофосфат, ThDP — тиаминдифосфат, ThTP — тиаминтрифосфат, TNS — 2-толуидинил-6-нафталинсульфонат, ANS — 1-анилино-8-нафталинсульфонат, PLP — пиридоксаль-5'-фосфат, Prg — пируват, PrgPE — фосфоенолпируват, PrgOEt — этиловый эфир пирувата.

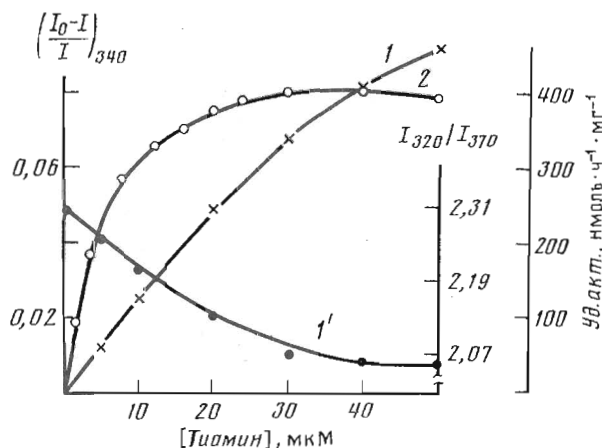


Рис. 1. Зависимость эффективности тушения, $(I_0 - I/I_{340})$ (1), положения спектра флуоресценции I_{320}/I_{370} (1') и удельной ферментативной эффективности (2) тиаминкиназы от концентрации тиамин. Условия определения: 0,01 М трис-НСl-буфер (pH 7,3), $[E]$ $0,8 \cdot 10^{-6}$ М, $\lambda_{возб}$ 296 нм, $\lambda_{фл}$ 340 нм

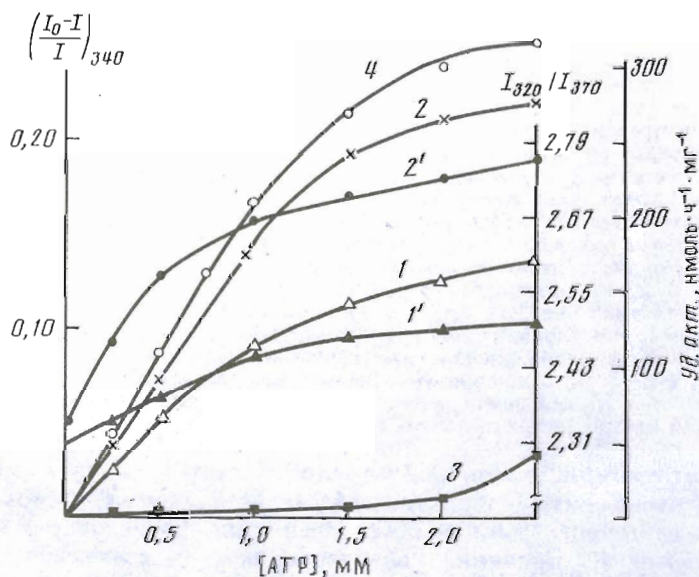


Рис. 2. Зависимость эффективности тушения (1, 2), положения спектра флуоресценции (1', 2') и удельной ферментативной активности (3, 4) тиаминкиназы от концентрации АТФ в отсутствие Mg^{2+} (1, 1') и при его внесении в концентрации $1 \cdot 10^{-3}$ (3) и $5 \cdot 10^{-3}$ М (2, 2', 4). Условия определения см. в подписи к рис. 1

дрожжей [6]. Описаны кинетическая модель функционирования тиаминкиназы, ее субстратная специфичность, аллостерическая регуляция ионами металлов, механизм действия. Однако каких-либо сведений, касающихся пространственной организации молекулы фермента, ее внутримолекулярной подвижности и взаимосвязи между структурой и возможностью регуляторного контроля активности белка при его пространственной перестройке, в литературе не имеется.

Для тиаминкиназы из пивных дрожжей в работах [7, 8] изучены некоторые спектрально-кинетические и поляризационные характеристики собственной флуоресценции белка. Показана значительная неоднородность излучающих остатков триптофана, локализованных в гидрофобном

Спектральные и поляризационные характеристики флуоресценции комплексов тиаминокиназы с производными тиамина, АТР и ионами Mg^{2+} в 0,01 М трис-НСI-буфере, рН 7,3 ($\lambda_{возб}$ 296 нм, T 293 К)

Соединение	$I_{\text{фл}}^{\text{max}}$	I_{320}/I_{370}	P_{215}^{340} *
Тиаминокиназа (Е)	1,00	1,21	0,18
Е+ Mg^{2+}	0,95	1,21	0,18
Е+Th	0,92	1,19	0,18
Е+Th+ Mg^{2+}	0,89	1,20	0,18
Е+ThMP	0,92	1,19	0,18
Е+ThDP	0,92	1,19	0,18
Е+ThTP	0,91	1,17	0,18
Е+ThTP+ Mg^{2+}	0,87	1,17	0,18
Е+АТР	0,99	1,23	0,19
Е+АТР+ Mg^{2+}	0,97	1,23	0,19

[Th]=[ThMP]=[ThDP]=[ThTP]= 10^{-5} М, [АТР]=[Mg^{2+}]= 10^{-3} М, [Е] 0,24 М. Здесь и в остальных таблицах M_r 96 кДа.

* Нижний индекс относится к степени поляризации (P), соответствует длине волны возбуждения, верхний — длине волны регистрации флуоресценции.

окружении внутри белковой глобулы. На основании анализа спектральной зависимости кинетики затухания флуоресценции выделены три группы триптофановых остатков, которые различаются излучающими свойствами и наносекундной спонтанной подвижностью.

В настоящей работе продолжено изучение структурной организации и внутримолекулярной подвижности тиаминокиназы. Оно направлено на исследование влияния субстратов, кофакторов и эффекторов на параметры триптофановой флуоресценции тиаминокиназы и ее комплексов с флуоресцирующей меткой (PLP) или зондами (ANS и TNS).

Из основных метаболитов клетки, оказывающих непосредственное влияние на скорость биосинтеза ThDP, особый интерес вызывают субстраты тиаминокиназной реакции: АТР и тиамин. Как видно из рис. 1, связывание тиамина с тиаминокиназой сопровождается тушением ее триптофановой флуоресценции (кажущееся значение константы Штерна — Фольмера, K_{sv} , оцененное по начальному наклону кривой тушения, для тиамина равно $2,5 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$) и незначительным длинноволновым сдвигом спектра, характеризуемым уменьшением отношения интенсивности флуоресценции при 320 нм к интенсивности при 370 нм (I_{320}/I_{370} , кривая 1'). Заметного изменения степени поляризации при этом не происходит. ThMP и ThDP тушат флуоресценцию фермента с эффективностью, близкой к эффективности тушения тиамином (табл. 1). Связывание молекул белка с ThTP проявляется в еще более значительном длинноволновом сдвиге спектра излучения.

Взаимодействие тиаминокиназы с АТР приводит к принципиальным спектральным изменениям (рис. 2). В этом случае наблюдается коротковолновое смещение спектра флуоресценции белка, сопровождающееся некоторым уменьшением интенсивности (для АТР $K_{sv} = 1,10 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1}$). Эффективность тушения флуоресценции и величина сдвига спектра уменьшаются по мере насыщения центров связывания субстратом. Это объясняется тем, что тиамин и АТР связываются с макромолекулой белка в различных, пространственно разобщенных участках, при этом фосфатные группы не играют решающей роли в связывании, т. е. взаимодействие тиамина и его фосфорных эфиров с тиаминокиназой осуществляется через пиримидиновый компонент, а взаимодействие АТР — по-

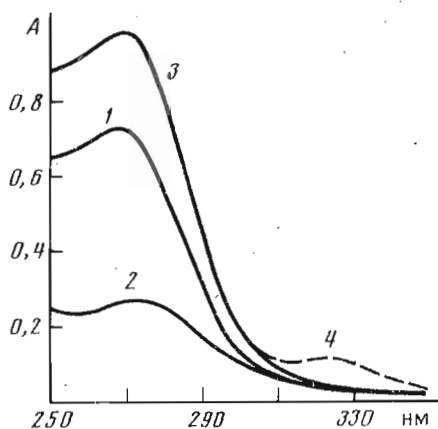


Рис. 3

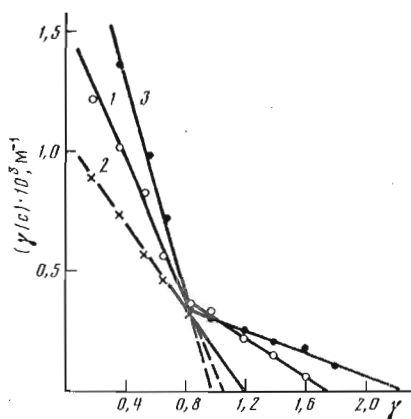


Рис. 5

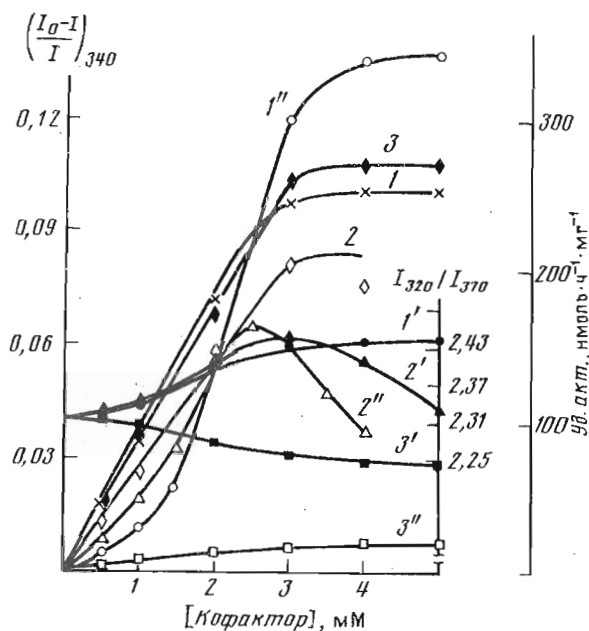


Рис. 4

Рис. 3. Спектры поглощения растворов тиаминокиназы (1), тиамина (2) и комплекса тиаминокиназа - тиамин (3, 4) в нативном состоянии (3) и после 3-недельного хранения (4) в 0,01 М трис-НСl-буфере (рН 7,3). [E] 0,25 мг/мл, [Th] $8 \cdot 10^{-5}$ М.

Рис. 4. Зависимость эффективности тушения (1-3), положения спектра флуоресценции (1'-3') и удельной ферментативной активности (1''-3'') тиаминокиназы от концентрации ионов Mg^{2+} (1, 1', 1''), Mg^{2+} (2, 2', 2'') или Ca^{2+} (3, 3', 3''). Условия определения см. в подписи к рис. 1.

Рис. 5. Определение числа участков связывания Руг (1), РугРЕ (2) и РугОEt (3) с молекулой тиаминокиназы методом Скэтчарда.

средством аденинового цикла. Разнонаправленность изменений спектральных характеристик при связывании АТР и тиамина не противоречит имеющимся данным о том, что присоединение АТР и тиамина к молекуле фермента неупорядочено [9].

Наблюдаемые изменения спектра флуоресценции тиаминокиназы при связывании с производными тиамина и АТР могут быть следствием либо

селективного тушения свечения триптофановых остатков, имеющих соответственно более коротковолновый и длинноволновый спектры излучения, либо конформационных изменений белковой молекулы, ведущих к изменению полярности микроокружения хромофоров. В первом случае остатки триптофана должны входить в состав активного центра фермента. Такая ситуация имеет место, например, в случае транскетолазы [10]. Для выбора между указанными возможностями нами было исследовано влияние одного из субстратов реакции — тиамин — на спектры поглощения тиаминкиназы. Согласно рис. 3, внесение в раствор фермента тиамин не изменяет форму спектра поглощения в длинноволновой области, т. е. характерная для комплексов тиамин—триптофан в модельных системах и холотранскетолазы полоса переноса заряда в области 310 нм для тиаминкиназы из пивных дрожжей не проявляется. Этот комплекс начинает обнаруживаться при частичной денатурации фермента (рис. 3). Исходя из представленных данных, можно сделать вывод, что триптофановые остатки не входят в состав активного центра тиаминкиназы и в этой связи наблюдаемые незначительные изменения параметров триптофановой флуоресценции белковой молекулы при связывании ее с тиамином, по-видимому, являются следствием происходящих при этом локальных конформационных изменений. Очевидность такого утверждения вытекает и из сравнения реальных значений кажущихся констант ассоциации витамина со свободным триптофаном (K_a $4,4 \text{ M}^{-1}$ [11]), и из константы Михаэлиса, характеризующей сродство фермента к тиамину ($6 \cdot 10^{-6} \text{ M}$).

Гораздо более высокая эффективность тушения флуоресценции фермента тиамином и низкое значение константы Михаэлиса для него по сравнению с такими же характеристиками для АТР (K_m $1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$) свидетельствуют о более высоком сродстве тиаминкиназы к данному субстрату, что соответствует физиологическим концентрациям витамина и АТР в самой дрожжевой клетке. Для сравнения на рис. 1 и 2 представлены зависимости удельной ферментативной активности от концентрации субстратов. Ход кинетических кривых коррелирует с изменением спектральных параметров собственной флуоресценции фермента.

Для протекания тиаминкиназной реакции необходимы ионы Mg^{2+} , Mn^{2+} или Ca^{2+} [9], взаимодействие которых с ферментом либо формирует каталитически активную конформацию молекулы белка, либо ионы металлов выступают в качестве «якорной» группировки, не принимая непосредственного участия в акте катализа. В отношении ряда трансфераз из других источников достаточно однозначно показано, что истинным субстратом трансферазных реакций является комплекс металл—АТР [12, 13]. Учитывая физиологические концентрации ионов Mg^{2+} и АТР в дрожжевой клетке, а также зная константы ассоциации магния и нуклеозидтрифосфата, можно рассчитать, что в случае протекания реакции пирофосфорилирования тиамин в щелочных условиях при оптимальном рН (константа диссоциации комплекса $\text{Mg} \cdot \text{АТР}$ для тиаминкиназной реакции при рН 8,6 равна $1 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ [14]) концентрация свободных ионов магния и АТР составит в среде определения не более 3% от общей концентрации комплекса $\text{Mg} \cdot \text{АТР}$. При увеличении концентрации одного из лигандов в 2 раза концентрация другого свободного лиганда практически снизится до нуля. В этой связи спектральные и поляризационные характеристики собственной флуоресценции тиаминкиназы при ее связывании с ионами металлов были исследованы нами не только на фоне насыщения фермента кофактором, когда скорость ферментативной реакции достигнет V_{max} , но при соотношении металл — АТР, равном 1, при котором ионы двухвалентных металлов полностью связаны в составе комплекса металл — АТР (табл. 1).

Внесение в присутствии АТР в раствор тиаминкиназы ионов Mg^{2+} в концентрации $1 \cdot 10^{-3}$ М ($Mg^{2+}/АТР=1$) приводит к дальнейшему уменьшению интенсивности свечения (для $Mg \cdot АТР$ $K_{sv}=1,13 \cdot 10^2$ М⁻¹). Положение и форма спектра излучения, как и степень поляризации флуоресценции (P), при этом не изменяются (табл. 1). Не было обнаружено изменений и в длительности затухания флуоресценции.

Согласно проведенным экспериментам, ионы Ca^{2+} и Mn^{2+} , так же как и ионы Mg^{2+} , не оказывают существенного влияния на собственную флуоресценцию комплекса белок—АТР. В то же время в отсутствие нуклеозидтрифосфата как Ca^{2+} и Mn^{2+} , так и Mg^{2+} в используемых нами концентрациях оказались более эффективными тушителями триптофановой флуоресценции тиаминкиназы, чем комплекс $Mg \cdot АТР$, не влияющими, однако, на положение и форму спектра излучения. Воздействие ионов металла на комплекс белок—тиамин или белок—АТР сходно по эффективности воздействия на комплекс белок—АТР.

Характер кривых, отражающих параметры триптофановой флуоресценции тиаминкиназы, зависит от соотношения ионов кофактора и АТР в инкубационной среде. Увеличение концентрации кофактора по отношению к АТР приводит к значительному повышению интенсивности флуоресценции фермента и коротковолновому смещению спектра (рис. 2, кривые 2 и 2'). В присутствии избытка ионов Mg^{2+} при соотношении $Mg^{2+} - АТР$, равном 10, кривая интенсивности флуоресценции почти полностью совмещается с кривой зависимости скорости реакции от концентрации субстрата ($Mg \cdot АТР$) при насыщающей концентрации кофактора. При этом величина K_{sv} , характеризующая сродство фермента к кофактору, была значительно выше ($1,64 \cdot 10^2$ М⁻¹), чем в случае, когда Mg^{2+} и АТР использовались в эквимоларных количествах.

Сами ионы Mg^{2+} , Mn^{2+} или Ca^{2+} в концентрациях свыше $1 \cdot 10^{-3}$ М являются эффективными тушителями флуоресценции тиаминкиназы (рис. 4). В отсутствие АТР в среде инкубации связывание избыточных количеств ионов металлов с белком характеризуется усилением свечения возбужденных хромофоров, которое прекращается после насыщения лигандсвязывающих центров кофактором. Эффективность тушения для изученных нами ионов приблизительно одинакова, в то же время характер изменения положения спектра флуоресценции различен. Изменения спектральных параметров собственной флуоресценции тиаминкиназы происходят в том же диапазоне концентраций ионов металлов, в котором прослеживается и их активирующий эффект (рис. 4), однако корреляционные связи между интенсивностью свечения хромофоров и активностью фермента при действии металлов не для всех ионов в достаточной степени выражены. Наблюдаемые особенности влияния отдельных кофакторов на положение спектра флуоресценции и каталитическую активность, вероятно, могут быть обусловлены неоднозначностью мест связывания в самой белковой молекуле для ионов металлов и (или) различием в эффективности их сорбции. Известно, например, что для выполнения функции кофактора в принципе могут подходить многие ионы, но белковая глобула избирательно активируется лишь некоторыми из них с учетом всех свойств ионов [15]. Согласно данным по измерению активности тиаминкиназы, почти во всех случаях Mg^{2+} можно заменить на Mn^{2+} , тогда как другие двухзарядные ионы металлов, включая Ca^{2+} , его заменить не могут.

На основании полученных нами результатов по изучению влияния низких концентраций ионов металлов и комплекса металл—АТР (металл/АТР=1) на параметры собственной флуоресценции тиаминкиназы, а также учитывая имеющиеся в литературе данные по активации фермента [9], можно утверждать, что истинным субстратом реакции пиро-

фосфорилирования тиамин является комплекс металл—АТР, при этом ионы металла выступают связующим звеном, обеспечивающим дополнительное взаимодействие субстрата с белком, снижая одновременно избыточный отрицательный заряд на фосфате нуклеотида. Предварительная инкубация АТР с ферментом в отсутствие ионов двухвалентных металлов приводит к нарушению стерической комплементарности активного центра по отношению к истинному субстрату. Избыточное внесение кофактора (металл/АТР > 1) способствует формированию наиболее активной конформации молекулы тиаминкиназы, подтверждая адекватность постулируемой нами ранее кинетической модели функционирования фермента [9] и ее соответствие аллостерической модели Моно [16], которая, предусматривая для иона металла функцию активатора белка, оставляет за ним роль важного субстратного компонента, лимитирующего процесс связывания в активном центре молекулы $Mg \cdot ATR$.

Помимо субстратов и кофакторов тиаминкиназной реакции значимую роль в регуляции биосинтеза ThDP играет основной метаболит гликолиза — пируват. Определение количества участков связывания для пирувата в координатах Скэтчарда показывает, что присоединение его осуществляется по двум, очевидно разным, центрам белковой молекулы с константами связывания $K_s = 0,41 \cdot 10^3$ и $1,43 \cdot 10^3 M^{-1}$ (рис. 5). Характер связывания с лигандом отражается на спектральных и поляризационных параметрах собственной флуоресценции тиаминкиназы.

Как было показано в работе [8], изменение флуоресцентных характеристик белка при связывании с пируватом обусловлено переносом энергии электронного возбуждения с остатков триптофана на пируват и локальными конформационными изменениями структуры белковой молекулы. Из рис. 6 следует, что взаимодействие с пируватом сопровождается тушением триптофановой флуоресценции белка и изменением положения ее максимума, причем смещение спектра флуоресценции имеет двухфазный характер, меняющийся в зависимости от концентрации лиганда: при более низких концентрациях пирувата (до 0,6 мМ) прослеживается длинноволновый сдвиг спектра, который при повышении концентрации отчасти сменяется коротковолновым. В этой связи можно предположить, что изменение параметров собственной флуоресценции фермента отражает разнонаправленное изменение конформации молекулы белка, определяемое концентрацией пирувата. Подобные эффекты, как правило, объясняются наличием нескольких типов участков связывания лиганда на молекуле белка, взаимодействие с которыми вызывает вышеописанные структурные изменения. Следует отметить, что при концентрации пирувата $5 \cdot 10^{-3} M$, когда задействованы оба участка связывания с тиаминкиназой, происходит повышение подвижности ряда триптофановых остатков [8].

Двойное, разнонаправленное действие пирувата отмечено и в случае определения ферментативной активности, когда лиганд в концентрациях, близких к физиологическим, ингибирует ($K_i 0,42 \cdot 10^{-3} M$), а в более высоких активирует ($K_a 2,1 \cdot 10^{-3} M$) биосинтез ThDP (рис. 6). Таким образом, пируват, являясь субстратом ряда метаболически важных ThDP-зависимых белковых систем, оказывает выраженное регуляторное влияние на активность тиаминкиназы — фермента биосинтеза коферментной формы витамина B_1 . Отсюда повышение содержания пирувата в клетке до нормы, не превышающей его физиологическую концентрацию, будет вести к ингибированию биосинтеза кофермента и соответственно к снижению скорости реакции декарбоксилирования (положительная обратная связь), в то время как дальнейшее повышение содержания эффектора до концентрации, превосходящей его физиологический уровень, на-

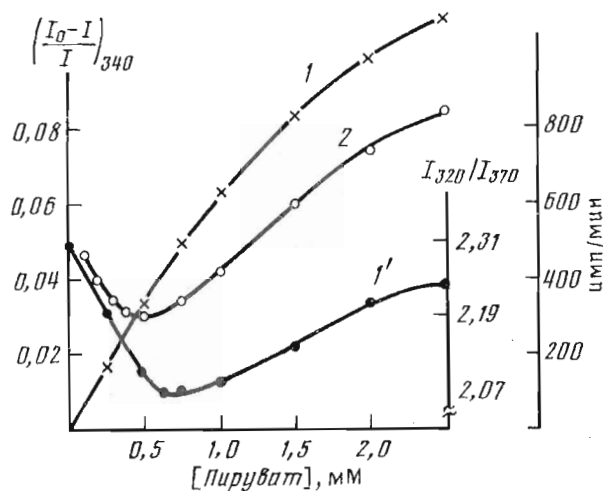
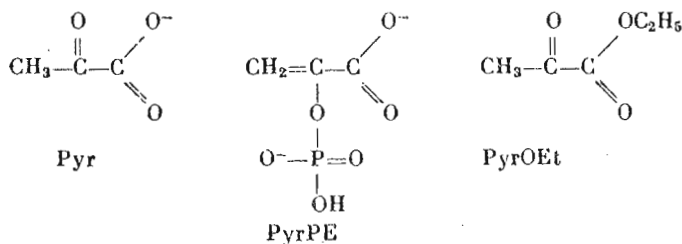


Рис. 6. Зависимость эффективности тушения (I), положения флуоресценции (I') и ферментативной активности (2) тиаминпирувата от концентрации пирувата. Условия определения см. в подписи к рис. 1

против, через активацию наработки ThDP будет способствовать усилению утилизации пирувата по принципу отрицательной обратной связи.

Из химического строения пирувата очевидно, что он может адсорбироваться в гидрофобной области молекулы белка за счет метильной группы и в гидрофильной с помощью карбоксила и карбонила. Естественно было ожидать, что при связывании в ингибиторном и активаторном центрах используются различные группировки молекулы. С целью получения дополнительной информации об этом нами использованы структурные аналоги пирувата PygPE и PygOEt. В силу своих структурных особенностей PygPE практически лишен возможности адсорбироваться в гидрофобных участках молекулы фермента и не имеет карбонильной группы, тогда как PygOEt, наоборот, обладает повышенными гидрофобными свойствами и содержит две карбонильные группы.



Замена карбонильной группы в молекуле пирувата на фосфоенольную меняет характер взаимодействия лиганда с белком. Незначительное тушение триптофановой флуоресценции тиаминпирувата под действием PygPE сопровождается однонаправленным длинноволновым сдвигом спектра флуоресценции (рис. 7). Так же как и для пирувата [8], эффективность воздействия PygPE на белок возрастает при добавлении ионов металлов. Константа Штерна — Фольмера увеличивается с 0,2 до $0,4 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1}$ соответственно в отсутствие и в присутствии $5 \cdot 10^{-3} \text{ M Mg}^{2+}$. Отсюда можно предположить, что истинным эффектором белка является комплекс PygPE — Mg^{2+} . Ион металла, который, как известно, присоединяется по фосфатной

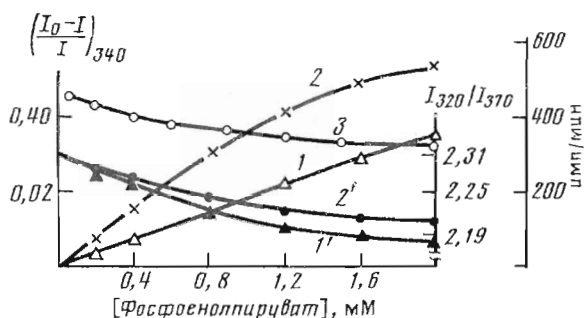


Рис. 7. Зависимость эффективности тушения (1, 2), положения спектра флуоресценции (1', 2') и ферментативной активности (3) тиаминокиназы от концентрации РугРЕ при $[Mg^{2+}]$ 0 (1, 1'), и $5 \cdot 10^{-3}$ М (2, 2', 3). Условия определения см. в подписи к рис. 1

группе РугРЕ, в данном случае может выступать дополнительным связующим звеном, обеспечивающим взаимодействие лиганда с ферментом. Наблюдаемые различия в спектральных характеристиках флуоресценции комплексов Е-Руг и Е-РугРЕ могут быть следствием того, что РугРЕ имеет только один участок сорбции на поверхности молекулы белка. Подтверждение тому — почти полная потеря для РугРЕ способности к активации биосинтеза ThDP при сохранении для него возможности к ингибированию (K_i $0,9 \cdot 10^{-3}$ М). Об этом же свидетельствует и наличие для последнего единственного участка связывания (рис. 5), причем значение константы связывания ($1,05 \cdot 10^3$ М $^{-1}$) для РугРЕ близко к значению K_s для пирувата в активирующем центре фермента ($1,4 \cdot 10^3$ М $^{-1}$).

Этерификация молекулы пирувата приводит к увеличенному сродству РугОEt к первому, более быстро реагирующему участку тиаминокиназы (K_s $2,18 \cdot 10^3$ М $^{-1}$) и некоторому ослаблению сродства ко второму (K_s $0,32 \cdot 10^3$ М $^{-1}$), однако как активирующий, так и ингибирующий эффекты изменения скорости биосинтеза ThDP при этом снижаются (соответственно на 26 и 47% по сравнению с пируватом). Количество участков связывания остается равным двум. Характер взаимодействия центров, связывающих РугОEt, зависит прежде всего от концентрации субстрата — тиамина (рис. 8). S-образный характер зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации эффектора обнаруживается лишь при достаточно малых концентрациях субстрата и исчезает с ростом последней при одновременном уменьшении величины полунасыщения для РугОEt (кривые 1, 2). 3-Минутная обработка раствора тиаминокиназы при 52° С приводит к утрате чувствительности макромолекулы к аллостерическому эффектору при сохранении каталитической активности, указывая тем самым на пространственную разделенность активных центров и центров связывания РугОEt.

Эти результаты показывают, что ингибиторный и активаторный центры тиаминокиназы задействованы в том случае, если молекула эффектора содержит группы с выраженными гидрофобными и гидрофильными свойствами (Руг и РугОEt). Для выполнения функции активатора необходимо наличие карбонильной группы. Учитывая более высокое значение K_s для РугОEt по сравнению с соответствующей величиной для пирувата, можно предположить, что ингибиторный центр фермента гидрофобен. Однако при этом остается неясной причина ингибирования реакции под действием РугРЕ, а также степень удаленности регуляторного центра от активного. Получить такого рода информацию часто удается с помощью флуоресцент-

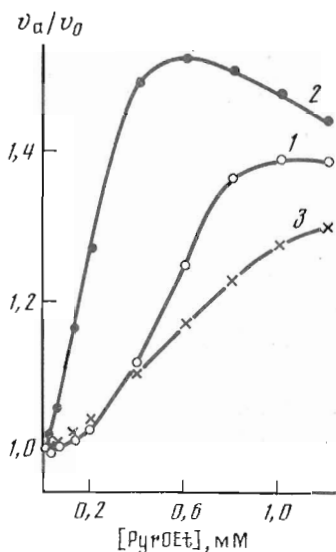


Рис. 8. Зависимость относительной скорости ферментативной реакции от концентрации PyrOEt . [Тиамин]: $4,2 \cdot 10^{-6}$ М (1, 3), $2,1 \cdot 10^{-5}$ М (2); 1, 2 — при 40°C , 3 — после тепловой обработки при 52°C

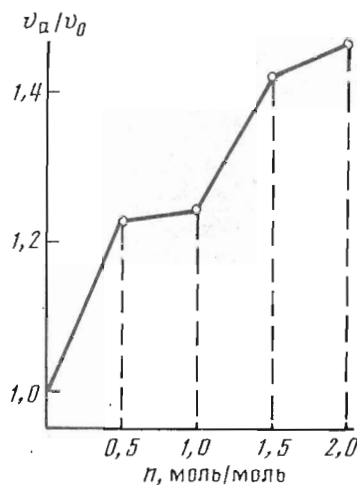


Рис. 9. Зависимость относительной скорости ферментативной реакции от мольного соотношения метка/белок в комплексе PLP-тиаминкиназа

ных меток или зондов, чувствительных к изменению полярности микроокружения, динамики или к наличию других хромофоров. В качестве таковых были выбраны PLP, ANS и TNS.

Известно, что PLP ковалентно связывается с белками через азометиновую связь по ϵ -аминогруппам лизиновых остатков или по концевым α -аминогруппам, образуя при этом Шиффово основание [17]. Для стабилизации комплекса E-PLP двойную связь восстанавливают боргидридом натрия. В зависимости от условий присоединения PLP к тиаминкиназе (избыток PLP) нами получены различные концентрационные соотношения молекул белка и метки. В табл. 2 приведены флуоресцентные характеристики меченого фермента при соотношениях белок — метка, равных 2:1, 1:1, 1:1,5 и 1:2. Определение количества участков связывания для PLP методом Скэтчарда показало, что молекула тиаминкиназы содержит два быстро реагирующих центра связывания метки с K_s $0,9 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$. Модификация аминокрупп белка приводит к выраженному увеличению скорости ферментативной реакции (рис. 9), причем характер изменения скорости от концентрации метки свидетельствует о неоднозначности обоих участков связывания. Активация PLP белковых молекул показана для ряда ферментных систем [18], но в отношении тиаминкиназы из пивных дрожжей известен лишь ингибирующий эффект органическими фосфатами, продуктами реакции (AMP, TMDP) в концентрациях, значительно превышающих их физиологическое содержание [9]. В этой связи увеличение скорости ферментативной реакции при ковалентном связывании белка с PLP, в эквимоллярных или близких к эквимоллярным концентрациях, ниже физиологических, очевидно, можно объяснить наличием в молекуле PLP карбоксильной группы, причем механизмы активации реакции фосфорилирования тиамина меткой и пируватом могут быть сходными.

Кривые затухания флуоресценции PLP, ковалентно связанного с тиаминкиназой, хорошо аппроксимируются суммой двух экспоненциальных членов с $\tau_1 = 4,40$ и $\tau_2 = 2,40$ нс (табл. 2). Исходя из этого можно предположить, что два компонента затухания свечения образованы хромофорами,

Флуоресцентные характеристики PLP в комплексах PLP-тиаминкиназы
($\lambda_{\text{возб}} 330 \text{ нм}$)
Условия определения: 0,01 М трис-HCl-буфер (pH 7,3), T 293 К, [E] 0,24 М

E: PLP, МОЛЬ/МОЛЬ	I_{330}/I_{400}	I_{400}/I_{330}^*	P_{330}^{400}	P_{330}^{440}	P_{365}^{440}	P_{295}^{400}	τ_1^{***}	τ_2^{***}	S_2^{***}
							HC		
2:1	0,79	0 28	0,20	0,19	0 22	0,18	4,56	2,22	0,65
1:1	0,79	0,47	0,17	0,17	0,23	0,12	4,45	2,46	0,72
1:1,5	0,78	0,77	0,15	0,13	0,22	0,09	4 40	2 21	0,75
1:2	0,77	1,06	0,13	0,11	0,21	0,08	4,35	2,44	0,78
1:2	0,69 **	—	—	—	—	—	—	—	—

* $\lambda_{\text{возб}} 295 \text{ нм}$. ** $\lambda_{\text{возб}} 365 \text{ нм}$. *** См. «Экспер. часть».

локализованными в двух местах связывания с тиаминкиназой. Наличие сдвига спектра флуоресценции при переходе от длины волны возбуждения 330 к 365 нм указывает на различие спектров поглощения и излучения связанных с белком молекул PLP. Кроме того, на длинноволновом краю спектра флуоресценции вклад короткоживущего компонента увеличивается, что означает, что хромофоры, имеющие меньшую длительность свечения, характеризуются более длинноволновым положением спектров флуоресценции и поглощения, чем хромофоры с большим временем жизни возбужденного состояния. Различие спектрально-кинетических свойств флуоресцентных меток отражает значительную гетерогенность центров связывания. Хромофоры, имеющие более длинноволновое поглощение и флуоресценцию, очевидно, расположены в более полярных областях белка. Они испытывают значительное динамическое тушение полярными белковыми группами, приводящее к уменьшению длительности их свечения. Второй центр связывания более гидрофобен, и молекулы PLP, локализованные в нем, имеют коротковолновые спектры поглощения и флуоресценции (в дальнейшем будем называть их соответственно «гидрофобным» и «гидрофильным» центрами).

Оба центра имеют достаточно высокую нано- и субнаносекундную вращательную подвижность относительно белковой молекулы, о чем свидетельствуют невысокие, не превышающие 0,23, значения степени поляризации флуоресценции, P (табл. 2). Как видно из табл. 2, увеличение относительной концентрации метки приводит к существенному уменьшению степени поляризации и длинноволновому смещению спектра излучения, если возбуждение осуществлялось в области максимума спектра поглощения. Кроме того, в этом случае заметно увеличивается (с 0,65 до 0,78) вклад гидрофильных центров, излучение которых характеризуется меньшей длительностью. Однако изменения степени поляризации при возбуждении флуоресценции в области 365 нм не наблюдаются. Более того, при длинноволновом возбуждении прослеживается некоторое коротковолновое смещение спектра излучения.

Эти результаты показывают, что между метками осуществляется обмен энергией электронного возбуждения, имеющий преимущественно направленный характер от хромофоров с более коротковолновым спектром флуоресценции и большим $\tau_{\text{фл}}$ к более длинноволновым с меньшим $\tau_{\text{фл}}$. Увеличение относительной концентрации PLP ведет к увеличению числа донорно-акцепторных пар. Данный вывод подтверждается уменьшением τ_1

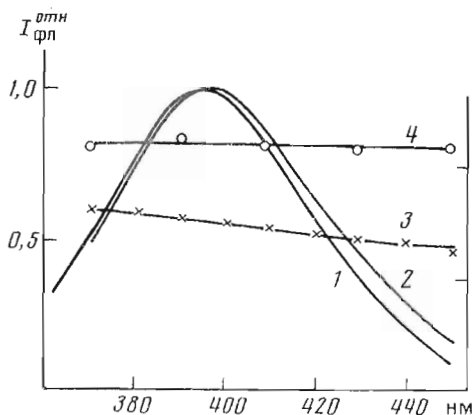


Рис. 10

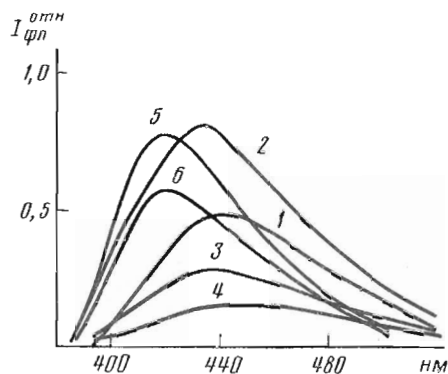


Рис. 11

Рис. 10. Спектры флуоресценции (1, 2) и спектральная зависимость степени поляризации (3, 4) комплекса PLP—тиаминкиназа в 0,01 М трис-HCl-буфере (7, 3) при $\lambda_{возб}$ 340 (1, 3) и 360 нм (2, 4)

Рис. 11. Влияние АТФ (2), тиамин (3, 6) и пирувата (4) на спектры флуоресценции TNS, связанного с тиаминкиназой (1—4) и ее комплекса с Mg^{2+} (5, 6). Условия определения: [E] 0,25 мг/мл, [тиамин] $5 \cdot 10^{-5}$, [АТФ] $5 \cdot 10^{-4}$, $[Mg^{2+}] 1 \cdot 10^{-3}$, [Pyg] $5 \cdot 10^{-3}$ М; 0,01 М трис-HCl-буфер (рН 7,3), $\lambda_{возб}$ 350 нм

и увеличением τ_2 при повышении соотношения Е—PLP (табл. 2), а также зависимостью $P=f(\lambda_{фл})$ (рис. 10).

При длине волны возбуждения 365 нм, когда перенос энергии между метками маловероятен, степень поляризации не зависит от соотношения Е—PLP (табл. 2). Поскольку в этом случае было обнаружено коротковолновое смещение спектра излучения по мере увеличения концентрации PLP, можно заключить, что гидрофобный зонд имеет несколько меньшую константу связывания.

Расстояние между центрами связывания меток, R , можно оценить, воспользовавшись формулой Ферстера для диполь-дипольного переноса энергии:

$$R^6 = R_0^6 / (\tau_0 / \tau - 1),$$

где R_0 — критический радиус переноса, рассчитываемый из перекрытия спектров поглощения и излучения [19], τ и τ_0 — длительность флуоресценции доноров (в нашем случае меток в «гидрофобном» центре) в присутствии и в отсутствие акцепторов. Предполагая, что $\tau_0 = 4,6$, а $\tau = 4,3$ нс, т. е. что при соотношении Е—PLP, равном 1:2, имеет место насыщение молекул тиаминкиназы донорно-акцепторными парами, получим $R = 19,0$ Å.

Помимо описанного выше обмена энергией между центрами связывания PLP в модифицированной тиаминкиназе наблюдается также перенос энергии электронного возбуждения от триптофановых остатков на метку. Это проявляется в сильном уменьшении степени поляризации флуоресценции метки при длине волны возбуждения 295 нм в области поглощения остатков триптофана белка (табл. 2). Перенос энергии приводит к значительному уменьшению длительности флуоресценции триптофановых остатков.

Наиболее значительный перенос энергии наблюдается для триптофанилов третьего типа [8], локализованных в наиболее гидрофобном окружении (табл. 3). При соотношении Е—PLP, равном 1:2, вклад в излучение триптофанилов этого типа при $\lambda_{фл} = 330$ нм уменьшается с 0,25 до 0,09, причем изменение интенсивности соответствует изменению длительности свечения. К сожалению, количественно оценить расстояния между остат-

Таблица 3

Параметры кинетики собственной флуоресценции тиаминокиназы
($\lambda_{\text{возб}}$ 296, $\lambda_{\text{фл}}$ 330 нм) при ее ковалентном связывании с PLP
Условия определения см. в подписи к табл. 2

Комплекс	τ_1 *	τ_2	τ_3	S_1	S_2	S_3
	нс					
Е	6,30	3,16	1,01	0,328	0,418	0,254
Е - PLP (1 : 2)	4,05	1,49	0,32	0,285	0,625	0,085

* См. «Экспер. часть».

Таблица 4

Влияние субстратов и эффекторов на параметры флуоресценции
комплекса тиаминокиназа - PLP (1 : 1)
[Th] = 10^{-5} М, [АТР] = [Mg²⁺] = [Pyg] = 10^{-3} М. Условия определения
см. в подписи к табл. 2

Добавленный к комплексу реагент	I_{380}^*	I_{450}^{**}	I_{450}^*	P_{330}^{450}
—	1,00	1,00	1,00	0,17
АТР	1,00	0,94	0,94	0,17
Th	1,01	0,98	0,98	0,17
Mg ²⁺	0,97	0,92	0,93	0,16
Mg ²⁺ + АТР	0,97	0,95	0,97	0,17
Pyg	0,94	0,90	0,89	0,17
Pyg + Th	0,92	0,96	0,94	0,17

* $\lambda_{\text{возб}}$ 330 нм. ** $\lambda_{\text{возб}}$ 360 нм.

ками триптофана и метками белка сделать практически невозможно из-за мультидонорности, т. е. значительной гетерогенности самой системы. В то же время необходимо отметить, что рассчитанный по формуле Ферстера критический радиус R_0 диполь-дипольного переноса энергии с остатков триптофана тиаминокиназы на PLP равен 22,1 Å. Это расстояние сравнимо с размерами молекулы белка, и в этой связи можно было ожидать полного тушения триптофановой флуоресценции белка пиридоксальфосфатом. Поскольку этого не происходит, следует полагать, что некоторые триптофаны имеют по отношению к молекулам метки неблагоприятное для переноса энергии пространственное расположение.

Результаты по воздействию субстратов и эффекторов на флуоресценцию меченной PLP тиаминокиназы приведены в табл. 4. В качестве параметров, характеризующих флуоресцентные свойства метки, выбраны интенсивность свечения на коротковолновом (I_{380}) и длинноволновом (I_{450}) краях спектра и степень поляризации (P_{330}^{450}). Представленные данные показывают, что субстраты (главным образом АТР) тушат флуоресценцию «гидрофильной» метки, указывая на ее локализацию вблизи активного центра. При этом каких-либо изменений конформации белка в областях связывания меток не обнаруживается, о чем свидетельствует неизменность P_{330}^{450} и одинаковые значения параметра I_{450} при длинах волн возбуждения 330 и 360 нм. Внесение в раствор тиаминокиназы ионов Mg²⁺, оказывающих стабилизирующее воздействие на структуру макромолекулы,

Параметры стационарной флуоресценции TNS и ANS и константы их связывания K_s с тиаминкиназой (E) ($\lambda_{возб}$ 350 нм)
Условия определения см. в подписи к табл. 2

Комплекс	$\lambda_{фл}^{max}$, нм	P_{350}^{440}	P_{350}^{450}	B	$K_s \cdot 10^{-4}$, M ⁻¹
TNS (H ₂ O)	505±2,0	0,00	0,00	0,001	—
TNS (этанол)	435±1,0	0,00	0,00	0,40	—
E+ANS	468±1,0	0,25	0,23	0,03	0,5
E+TNS	443±1,0	0,26	0,26	0,09	2,0
E+TNS *	444±1,0	0,27	0,26	—	—

* $\lambda_{возб}$ 360 нм.

приводит к тушению флуоресценции меток, находящихся в обоих центрах связывания.

Как уже указывалось, пируват имеет два центра связывания на молекуле фермента, которые, очевидно, являются регуляторными. Из табл. 4 видно, что взаимодействие пирувата с тиаминкиназой, меченой PLP, приводит к эффективному тушению флуоресценции обоих типов хромофоров метки, которое может быть следствием близости их центров связывания и обусловлено переносом энергии на тушитель. Последующее после пирувата присоединение к белку субстрата, тиамин, способствует дальнейшему тушению свечения гидрофобных меток и ослаблению тушения гидрофильных, что проявляется в снижении параметра I_{350}^{350} с 0,94 до 0,92 и увеличении параметра I_{60}^{450} с 0,93 до 0,96. Изменения флуоресцентных характеристик связанной с тиаминкиназой метки (PLP) при внесении в среду инкубации тиамин и пирувата не зависят от последовательности добавления субстрата или эффектора. Одновременно следует отметить, что эти изменения не аддитивны тем, которые наблюдаются при взаимодействии фермента отдельно с тиамином и пируватом. Это указывает на то, что центры их адсорбции находятся в функциональной взаимосвязи, которая реализуется посредством конформационных изменений белковой молекулы.

Рассмотрим результаты исследования структурной организации тиаминкиназы с использованием флуоресцентных зондов — ANS и TNS. В отличие от PLP флуоресцентные зонды нековалентно связываются в гидрофобных областях белковых молекул — как правило, вблизи их активных центров или мест сорбции аллостерических эффекторов. Взятые нами красители в водных растворах обладают крайне слабой флуоресценцией, однако при связывании с макромолекулами или мембранами квантовый выход их флуоресценции увеличивается на 2—3 порядка. Это обстоятельство позволяет практически не учитывать свечения присутствующего в растворе несвязавшегося зонда.

Общие флуоресцентные свойства зондов приведены в табл. 5. Константы связывания (K_s) определяли флуориметрически по методике, подробно описанной в монографии [20]. Приведенные значения K_s являются усредненными, поскольку используемый метод предполагает идентичность центров связывания. Несмотря на сходство структуры зондов, ANS и TNS значительно (в 4 раза) различаются по величинам K_s . Это свидетельствует о важности гидрофобных взаимодействий при образовании комплекса белок—зонд, т. е. в связывании с белком участвует гидрофобный гетероцикл, содержащий в случае TNS боковую метильную группу. Поскольку TNS

Влияние пирувата на флуоресценцию комплекса TNS — тиаминкиназа
($\lambda_{\text{возб}}$ 337 нм, [Pyg] $5 \cdot 10^{-3}$ М)

Условия определения см. в подписи к табл. 2

Комплекс	τ_1	τ_2	S_1	S_2	χ^2
	нс				
TNS (H ₂ O)	0,10±0,05	—	1,00	—	1,45
TNS (этанол);	7,9±0,44	—	1,00	—	1,25
E+TNS *	11,2±0,33	2,3±0,13	0,92	0,08	1,05
E+TNS **	11,3±0,42	1,9±0,21	0,90	0,10	1,34
E+TNS+Py _r **	10,2±0,40	1,9±0,20	0,88	0,12	1,36

* $\lambda_{\text{фл}}$ 450 нм. ** $\lambda_{\text{фл}}$ 480 нм.

лучше связывается с молекулой белка, очевидно, имеет смысл более подробно рассмотреть его флуоресцентные свойства. Согласно табл. 5, TNS в комплексе с тиаминкиназой имеет коротковолновое положение спектра флуоресценции (443 нм), что подтверждает его локализацию в гидрофобном участке макромолекулы. Квантовый выход свечения (B) при этом составляет 9%.

Неэкспоненциальность затухания флуоресценции TNS во многих случаях объясняется наличием наносекундной релаксации, при этом при краевом возбуждении, как правило, наблюдается bathochromное смещение спектров, достигающее, например, у сывороточного альбумина человека 14 нм [21]. При связывании TNS с тиаминкиназой использование длинноволнового возбуждения (39 нм) вызывает лишь незначительный сдвиг спектра излучения, не превышающий 1 нм (табл. 5). Увеличение температуры раствора до 35°С также не изменяет «краевого эффекта». Все это указывает на отсутствие наносекундной релаксации хромофоров. В этой связи главной причиной неэкспоненциальности законов затухания флуоресценции TNS является гетерогенность центров связывания зонда на молекуле фермента. Математический анализ кривых затухания показал, что они хорошо аппроксимируются суммой двух экспонент с различными значениями длительности: $\tau_1=11,2\pm0,41$ и $\tau_2=2,3\pm0,12$ нс (табл. 6).

Как известно, вода — эффективный тушитель флуоресценции TNS [20]. Тушение происходит по механизму переноса электрона на кластер, состоящий из четырех молекул воды. Для комплекса TNS — тиаминкиназа возможности образования кластера ограничены и поэтому тушение водой несущественно. Предполагается [22], что молекулы зонда в комплексе с белками могут иметь две конформации: плоскую, когда нафтильное и фенильное кольца находятся в одной плоскости (а), и тетраэдрическую с атомом азота в вершине тетраэдра (б). Конформер (а) вследствие смещения электронной плотности при возбуждении от фенильного кольца и атома азота к нафтильному обладает значительным дипольным моментом [22], поэтому его флуоресцентные свойства в отличие от конформера (б) зависят от полярности растворителя. Исходя из этого, можно допустить, что тип конформера в местах сорбции будет определяться свойствами центра, и прежде всего его геометрией. Отсюда вытекает, что оба компонента затухания флуоресценции обусловлены свечением двух различных центров. Хромофоры, имеющие большую длительность свечения, представляют собой конформеры (б) TNS, а хромофоры с меньшим $\tau_{\text{фл}}$ — конформеры (а). Конформер (а), вероятно, более подвижен и испытывает значительное динамическое тушение со стороны аминокислотных остатков белка. Вклад

этих хромофоров во флуоресценцию связанного с белком TNS незначителен и составляет 8% при $\lambda_{\text{в.л.}}$ 430 нм. С увеличением длины волны свечения вклад компонентов практически не изменяется (табл. 6), что указывает на близость их спектров излучения, а следовательно, и дипольных свойств окружения. В пределах спектра флуоресценции значение τ_1 остается неизменным, τ_2 уменьшается. Релаксационные процессы, протекающие параллельно с излучением, приводят к противоположной спектральной зависимости длительности свечения и поэтому не могут служить причиной наблюдаемых изменений τ_2 .

Как известно, непосредственную информацию о динамических свойствах связанных с белком молекул зонда дают поляризационные измерения. При отсутствии движений самого зонда деполяризация его флуоресценции будет происходить исключительно за счет броуновского вращения всей белковой глобулы. В этом случае расчет по формуле Левинсона—Перрена при значениях $P_0=0,44$ [20] и $M_r=96\,000$ для тетраэдрического олигомера тиаминкиназы дает значение $P=0,34$. Это значение близко к экспериментально определяемому (см. табл. 5). Высокие значения степени поляризации, постоянные в пределах всей полосы флуоресценции, свидетельствуют о жесткости окружения зонда, имеющего большую длительность свечения и вносящего наиболее значимый вклад в излучение, и об отсутствии у него наносекундной динамики. Отсутствие обмена энергией электронного возбуждения между зондами говорит о значительной (более 10 Å) пространственной разобщенности двух центров связывания TNS на молекуле тиаминкиназы. Наличие нескольких различных участков связывания для TNS было обнаружено нами и методом гель-фильтрации, при графическом представлении данных эксперимента в координатах Скэтчарда.

При внесении АТФ в раствор тиаминкиназы, после преинкубации белка с зондом, наблюдается значительное возрастание интенсивности свечения зонда и смещение максимума спектра флуоресценции в коротковолновую область приблизительно на 8 нм (рис. 11, 2). Это свидетельствует о том, что АТФ и TNS имеют различные области сорбции на молекуле белка, расположенные в непосредственной близости друг от друга, причем после связывания субстрата с белком заметно повышается гидрофобность микроокружения TNS. Скорее всего, АТФ ограничивает доступ к зонду молекул воды.

Другой субстрат — тиамин — конкурирует за место связывания с TNS, что выражается в тушении флуоресценции последнего в присутствии тиаминина (рис. 11, 3, 6), т. е. одним из двух участков локализации TNS на молекуле тиаминкиназы из пивных дрожжей является активный центр фермента. Однозначным тому подтверждением могут служить результаты по изучению торможения активности тиаминкиназы по отношению к тиамину под действием TNS (рис. 12). TNS — конкурентный ингибитор с константой ингибирования, равной $1,7 \cdot 10^{-5}$ М, что указывает на высокое сродство данного красителя к ферменту, близкое к сродству самого тиаминина (рис. 12). Второй центр связывания зонда, возможно, является центром аллостерической регуляции, так как флуоресценция TNS тушится пируватом (рис. 11, 4), что наблюдается при связывании эффектора в ингибиторном центре фермента. При концентрации пирувата $5 \cdot 10^{-3}$ М, когда его активирующее действие на ферментативную активность тиаминкиназы наиболее заметно, явно обнаруживается воздействие эффектора на оба центра связывания TNS (табл. 6). Модельные исследования тушения флуоресценции пируватом в водно-спиртовых растворах показали, что эффективное тушение флуоресценции комплекса зонд—белок лигандом не может быть объяснено иначе как связыванием тушителя с ферментом.

Сопоставление спектров излучения комплекса TNS—тиаминкиназа после внесения в раствор тиаминина и после внесения пирувата (рис. 11)

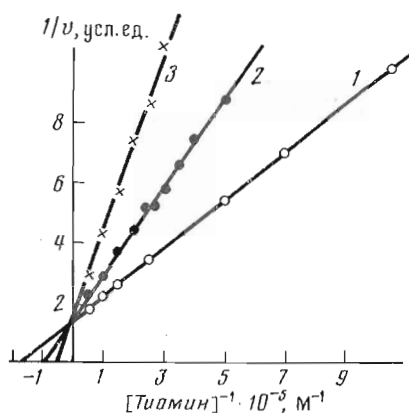


Рис. 12

Рис. 12. Зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации тиамин в координатах Лайнуивера – Берка. $[TNS]=0$ (1), $3 \cdot 10^{-5}$ (2) и $5 \cdot 10^{-5}$ М (3)

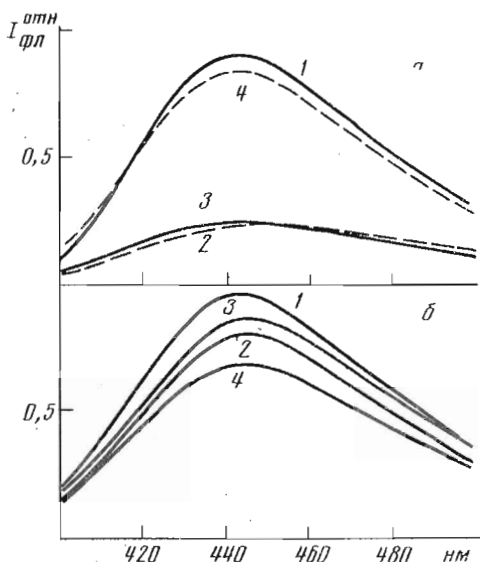


Рис. 13

Рис. 13. Влияние пирувата (2), PygPE (3), PygOEt (4) на спектры флуоресценции комплекса TNS – тиаминкиназа в 0,01 М трис-НСl-буфере (рН 7,3) (а) и TNS в водно-этанольном (1:20) растворе (б). [Эффектор] 0 (1), $5 \cdot 10^{-3}$ М (2–4). $\lambda_{возб}$ 350 нм

показывает, что функциональная взаимосвязь указанных выше метаболитов и тиаминкиназы реализуется, очевидно, следующим образом: конформационные перестройки в белке, происходящие вследствие связывания пирувата, способствуют большему раскрытию области активного центра фермента, обеспечивая тем самым лучший доступ к нему молекул тиамин. Одновременно повышается подвижность микроокружения активного центра. Характерные признаки такого взаимодействия – длинноволновое смещение спектра флуоресценции комплекса TNS–белок (рис. 11) и уменьшение длительности его свечения (табл. 5) под воздействием эффектора.

Структурные аналоги пирувата – этиловый эфир пирувата и фосфоенолпируват – различным образом влияют на флуоресценцию комплекса тиаминкиназа–TNS (рис. 13а, табл. 7). PygPE в концентрации $5 \cdot 10^{-3}$ М вызывает значительное (∞ в 5 раз) тушение флуоресценции связанного с ферментом зонда, PygOEt характеризуется более низкой эффективностью тушения. Результаты модельных исследований показывают (рис. 13б), что последний – наиболее эффективный тушитель флуоресценции водно-этанольных (1:20) растворов TNS. При этом следует отметить, что тушение флуоресценции TNS в основном статическое, обусловленное образованием нефлуоресцирующих комплексов зонда с молекулой тушителя, о чем свидетельствует более значительное уменьшение интенсивности свечения флуорофора по сравнению с уменьшением длительности (табл. 7). Следовательно, главной причиной уменьшения интенсивности флуоресценции связанного с тиаминкиназой TNS может быть диссоциация комплекса зонд–фермент и образование нового комплекса эффектора с зондом. Это возможно только в том случае, если эффекторы и TNS имеют общие или находящиеся в непосредственной близости друг от друга центры сорбции. В такой ситуации относительно невысокая эффективность тушения флуоресценции комплекса фермент–TNS под действием PygOEt подтверждает

Влияние пирувата, PygOEt и PygPE на параметры стационарной и разрешенной во времени флуоресценции TNS ($\lambda_{\text{возб}}$ 337 нм, $\lambda_{\text{фл}}$ 440 нм) при связывании с тиаминкиназой (5:1). [Эффектор] $5 \cdot 10^{-3}$ М
Условия определения см. в подписи к табл. 2

Эффектор	$\lambda_{\text{фл}}^{\text{max}}$, нм	$\bar{\tau}^*$	τ_1	τ_2	S_1	S_2
		нс				
—	443	10,8	11,20	2,4	0,92	0,08
Pyg	450	7,8	10,20	1,9	0,88	0,12
PygOEt	443	10,9	11,50	2,2	0,94	0,06
PygPE	443	8,0	9,18	2,5	0,85	0,15

* Среднюю длительность $\bar{\tau}$ определяли по формуле

$$\bar{\tau} = \frac{\sum_{i=1}^N \alpha_i \tau_i}{\sum_{i=1}^N \alpha_i}$$

правомочность сделанного выше вывода о важности карбоксильной группы пирувата в связывании с ферментом. Более того, карбоксильная группа пирувата существенна для связывания в активирующем центре тиаминкиназы, который находится вблизи центра сорбции тиаминкиназы. Эти выводы вытекают из сравнения результатов воздействия PygPE и пирувата на спектральные и кинетические характеристики комплекса фермент—TNS (рис. 11, табл. 7).

Несмотря на то что PygPE и пируват имеют общий центр связывания с тиаминкиназой, первый является ингибитором, вероятно, из-за отсутствия карбонильной группы. Определенную роль может играть и фосфатная группа PygPE, способная создать стерические препятствия взаимодействию тиаминкиназы с фосфатными группами АТФ.

Исследование воздействия ионов металлов на комплекс зонд—TNS—тиаминкиназа показало, что внесение в раствор фермента ионов Mg^{2+} после предварительной инкубации белка с TNS и далее с субстратами или эффекторами заметного влияния на параметры флуоресценции TNS не оказывает. Однако в случае, когда краситель первоначально взаимодействует с комплексом металл—белок и лишь затем с тиаминкиназой или пируватом, двухвалентные ионы металла вносят принципиальные изменения в флуоресцентные характеристики зонда (рис. 11). Зондирование тиаминкиназы посредством TNS после ее связывания с Mg^{2+} свидетельствует, что в результате воздействия кофактора на молекулу белка области локализации зонда приобретают исключительную гидрофобность. Данный вывод вытекает из того, что спектр флуоресценции комплекса Mg^{2+} —Е—TNS имеет очень коротковолновое положение ($\lambda_{\text{max}}=419$ нм, рис. 11), которое наблюдается у TNS, например, в бутаноле или диоксане [20]. В этой связи наиболее обоснованным выглядит предположение о том, что ионы металла связывают (фиксируют) подвижные полярные боковые группы аминокислот, которые ограничивают доступ субстратам и аллостерическим эффекторам белка к активному центру. В результате создаются оптимальные условия для протекания ферментативной реакции и ее аллостерической регуляции. При этом не исключена вероятность того, что после связывания с ионами металла в молекуле тиаминкиназы «открываются» дополнительные регуляторные участки взаимодействия с аллостерическими эффекторами. Сходная интерпретация результатов прослеживается при ана-

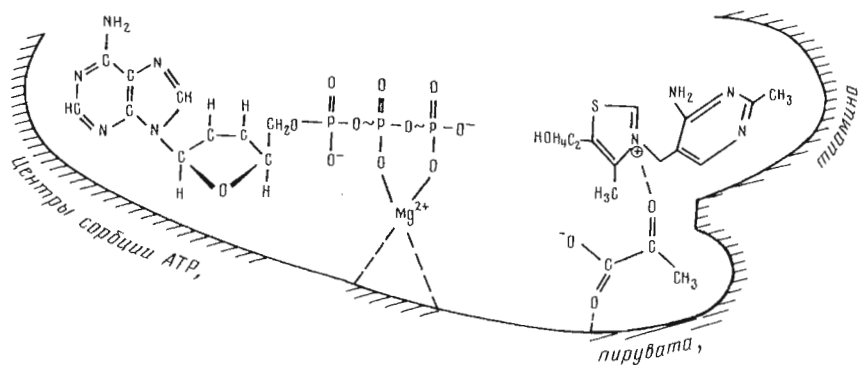


Рис. 14. Схема расположения субстратов и пирувата в активном центре тиаминкиназы

лизе зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации активатора (Mg^{2+}) в отсутствие и при наличии избытка ионов металла [9].

Таким образом, проведенные исследования позволяют сделать вывод, что активный центр дрожжевой тиаминкиназы представляет собой гидрофобную полость, в которой субстраты — тиамин и АТФ — адсорбируются так, что пиррофосфатный радикал субстрата-донора направлен в сторону субстрата-акцептора (рис. 14). Ионы двухвалентных металлов за счет связывания подвижных отрицательно заряженных групп белка и пиррофосфатной группы АТФ обеспечивают оптимальную геометрию сорбции молекул субстратов в активном центре фермента и, очевидно, способствуют их сближению.

Что касается активирующего эффекта пирувата, то, связываясь карбоксильной и, возможно, карбонильной группами в гидрофильной области в непосредственной близости от центра локализации тиамина, данный метаболит путем взаимодействия карбонильной группы пирувата с четвертичным азотом тиазола витамина В₁ может облегчать процесс отщепления продукта — ThDP — от молекулы тиаминкиназы. Кроме того, его связывание повышает сегментальную подвижность белковой молекулы, что может приводить к увеличению скорости реакции.

Известные в настоящее время данные позволили рассмотреть лишь достаточно общие вопросы структуры фермента и непосредственно его активного центра. Химический состав микроокружения активного центра, его строение, а также роль четвертичной структуры фермента являются задачами дальнейших исследований.

Экспериментальная часть

В работе использовали АТФ, PyrPE, NADH и наборы для электрофореза (Reanal, Венгрия); ANS, TNS и Pyr (Sigma, США); PLP (Merck, ФРГ); тиамин, ThMP и ThDP (Fluka, Швейцария); сефадекс G-50 (Pharmacia, Швеция). Остальные реактивы — марки ос. ч. или х. ч. (Союзреактив, СССР).

Тиаминкиназу из пивных дрожжей (КФ 2.7.6.2) выделяли по описанной ранее методике [9]. Чистоту ферментного препарата контролировали методом диск-электрофореза в 7% ПААГ с использованием трис-глицинового электродного буфера, pH 8.3, на приборе фирмы Reanal (Венгрия), модель 69. На заключительном этапе получали гомогенный белок, который хранили при 4°С без снижения ферментативной активности в течение

недели. Активность фермента определяли по методу [23] с модификациями, указанными в работе [6]. Количество образовавшегося в тиаминкиназной реакции ThDP находили при помощи апопируватдекарбоксилазы [24]. Активность рекомбинированной за 30 мин при 20°С и pH 6,8 холопируватдекарбоксилазы, пропорциональную содержанию ThDP в пробах, оценивали по убыли NADH в присутствии алкогольдегидрогеназы [25]. Калибровочный график строили с хроматографически чистым препаратом ThDP. Белок определяли по методу Лоури [26] и спектрофотометрически по поглощению при 280 нм. Удельную активность тиаминкиназы выражали в нмоль ThDP, образовавшегося за 1 ч при 40°С в расчете на 1 мг белка ферментного препарата.

При оценке скорости биосинтеза ThDP в присутствии аллостерических эффекторов (Pyr, PyrPE или PyrOEt) в качестве акцептора пирофосфатных группировок вместо тиамин использовался меченый субстрат — [тиазол-2-¹⁴C]тиамин. В остальном состав инкубационной смеси идентичен описанному в работе [9]. После остановки реакции смесь разбавляли 0,02 М трис-HCl-буфером (pH 8,0) до 10 мл и разделяли на колонке (1,2×10 см) с DEAE-сефадексом А-25. Несвязавшийся [¹⁴C]тиамин удаляли исходным буфером, [¹⁴C]ThDP элюировали 25 мл 0,5 М HCl. Концентрацию [¹⁴C]ThDP находили из известной удельной радиоактивности меченого тиамин. Радиоактивность измеряли на сцинтилляционном счетчике Mark-II (Nuclear Chicago, США). Активность фермента в этом случае выражали в условных единицах (имп/мин), учитывая, что биосинтез 1 нмоль ThDP соответствует его радиоактивности 0,9 имп/мин.

Изменения структурной организации тиаминкиназы при взаимодействии с субстратами, кофакторами или эффекторами регистрировали после 20 мин преинкубации компонентов в среде определения. Количество пирувата, PyrPE, PyrOEt, зонда или метка, связавшихся с белком, определяли методом гель-фильтрации на колонке (1,2×40 см) с сефадексом G-50 [27]. Число мест связывания и значения кажущихся констант связывания рассчитывали из зависимости γ/c от γ , где c — концентрация лиганда, γ — соотношение связанный лиганд/белок, моль/моль [28]. Присоединение PLP к молекуле тиаминкиназы проводили согласно методике [29]. Восстановление двойной связи осуществляли боргидридом натрия с последующим удалением избытка PLP гель-фильтрацией через сефадекс G-50.

Спектры флуоресценции фиксировали на люминесцентной установке СДЛ-2 (ЛОМО, СССР), при этом спектральная ширина щелей не превышала 1 нм. Измерения при комнатной температуре проводили в прямоугольных кюветах со стороной 1 см. В ходе флуоресцентных исследований количество образца подбирали таким образом, чтобы его поглощение при длине волны возбуждения не превышало 0,05 ОЕ. Спектры флуоресценции корректировали с учетом спектральной чувствительности флуориметра. Квантовый выход флуоресценции (B) определяли относительно водного раствора триптофана, для которого $B=0,20$ [30]. Положение спектров собственной флуоресценции растворов белка и его комплексов с меткой определяли по величине отношения интенсивностей флуоресценции I_{315}/I_{350} или I_{315}/I_{370} и соответственно I_{370}/I_{430} , которые относятся к коротко- и длинноволновым краям спектров. Эффективность переноса энергии с остатков триптофана на PLP оценивали из отношения интенсивностей I_{400}/I_{330} , измеренных вблизи максимумов спектров флуоресценции акцептора и донора. Данные по тушению флуоресценции белка лигандами представляли графически в координатах Штерна—Фольмера согласно уравнению

$$(I_0 - I)/I = K_{sv}[Q],$$

где I_0 и I — интенсивности флуоресценции образца в отсутствие и в при-

существовании тушителя в концентрации Q ; K_{av} — константа Штерна — Фольмера. Состав буфера, концентрации лигандов и белка указаны в подписях к рисункам и таблицам.

Измерение длительности флуоресценции производили на импульсном флуориметре [31]. Анализ регистрируемых кривых затухания с учетом длительности возбуждающего импульса и функции отклика системы регистрации (обращение свертки) производили с помощью специальной программы, реализующей метод Пауэлла [32]. Функцию затухания флуоресценции $f(t)$ представляли в виде суммы i экспонент:

$$f(t) = \sum_{i=1}^3 \alpha_i e^{-t/\tau_i},$$

где α_i и τ_i — амплитуда и длительность затухания i -й компоненты свечения. Представление функции $f(t)$ в виде одной экспоненты ($i=1$) или суммы двух или трех экспонент ($i=2, 3$) осуществляли, исходя из минимума значений статистического критерия χ^2 временной зависимости функции распределения взвешенных остатков и их автокорреляционной функции [33].

Вклад i -й компоненты S_i в общее затухание флуоресценции определяли из соотношения

$$S_i = \alpha_i \tau_i / \sum_{i=1}^N \alpha_i \tau_i,$$

где $N=1, 2, 3$. Для учета спектральной зависимости системы регистрации флуориметра использовался метод «эталонного» соединения [34]. В качестве таких соединений использовали n -терфенил (спектральная область 300–400 нм) и РОРОР (n -бис[2-(5-фенилоксазолил)]бензол) (спектральная область 380–500 нм), имеющих экспоненциальное затухание флуоресценции [35].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Островский Ю. М. Активные центры и группировки в молекуле тиамина. Минск: Наука и техника, 1975. 422 с.
2. Метаболические эффекты недостаточности функционально связанных В-витаминов/Ред. Ю. М. Островский. Минск: Наука и техника, 1987. С. 44–77.
3. Арцукевич И. М., Воскобоев А. И., Островский Ю. М. // Вopr. мед. химии. 1977. Т. 23. № 2. С. 203–240.
4. Hamada M. // J. Jap. Biochem. Soc. 1969. V. 41. № 3. P. 837–842.
5. Mitsuda H., Takii Y., Iwami K., Yasumoto K. // J. Nutr. Sci. Vitaminol. 1975b. V. 21. № 2. P. 103–115.
6. Воскобоев А. И., Островский Ю. М., Черникевич И. П. // Биоорг. химия. 1975. Т. 1. № 10. С. 1489–1497.
7. Черникевич И. П., Маскевич А. А., Наумов А. В., Маскевич С. А., Кивач Л. Н., Воскобоев А. И. // Укр. биохим. журн. 1989. Т. 61. № 5. С. 34–42.
8. Маскевич А. А., Черникевич И. П., Маскевич С. А., Кивач Л. Н., Гачко Г. А. // Журн. физ. химии. 1990. Т. 64. № 8. С. 2162–2168.
9. Воскобоев А. И., Черникевич И. П. Биосинтез, деградация и транспорт фосфорных эфиров тиамина. Минск: Наука и техника, 1987. 200 с.
10. Кочетов Г. А. Тиаминовые ферменты. М., 1978. 234 с.
11. Forzani B., Mariani P. H., Jordan F. // Biochemistry. 1977. V. 16. № 6. P. 1105–1110.
12. Rabin B. R., Watts D. C. // Nature. 1960. V. 188. P. 1163–1167.
13. Грин Д., Гольдбергер Р. Молекулярные аспекты жизни: Пер. с англ. М.: Мир. 1968. 310 с.
14. Виноградов В. В., Струмило С. А. // Биохимия. 1979. Т. 44. № 1. С. 50–56.
15. Полторах О. М., Чухрай Е. С. Физико-химические основы ферментативного катализа. М.: Высш. школа, 1971. 311 с.
16. Monod J., Wyman J., Changeux J. P. // J. Mol. Biol. 1965. V. 12. № 1. С. 88–102.
17. Черницкий Е. А., Слабожанина Е. И. Спектральный люминесцентный анализ в медицине. Минск: Наука и техника, 1989. 141 с.

18. Viljoen C. C., Visser L., Botes P. P. // *Biochim. et biophys. acta*. 1977. V. 483. № 1. P. 107–120.
19. Ермолаев В. Л., Бодунов Е. И., Свешникова Е. Б., Шахвердов Е. А. Безызлучательный перенос энергии электронного возбуждения. Л.: Наука, 1977. 311 с.
20. Владимиров Ю. А., Добрецов Г. Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. М.: Наука, 1980. 320 с.
21. Демченко А. П. Люминесценция и динамика структуры белков. Киев: Наук. думка, 1988. 280 с.
22. Kumbar M., Maddaiah V. T. // *Biochim. et biophys. acta*. 1977. V. 497. № 3. P. 707–718.
23. Ultrich J. // *Meth. Enzymol.* 1970. V. 18A. P. 109–115.
24. Kaziro Y. // *J. Biochem.* 1957. V. 44. № 7. P. 827–838.
25. Naveke R., Goedde H. W., Holzer H. // *Arch. Microbiol.* 1962. B. 44. S. 93–101.
26. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // *J. Biol. Chem.* 1951. V. 193. № 1. P. 265–275.
27. Керридж Д., Триптон К. Биохимическая логика: Пер. с англ. М.: Мир, 1974. 328 с.
28. Scatchard G. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1949. V. 51. P. 460–467.
29. Chang S.-I., Hammes G. G. // *Biochemistry*. 1989. V. 29. № 9. P. 3781–3788.
30. Бурштейн Э. А. Люминесценция белковых хромофоров (модельные исследования) // Итоги науки и техники. Сер. Биофизика / ВИНТИ. М., 1976. Т. 6. 171 с.
31. Гачко Г. А., Зыбельт В. К., Кивач Л. Н., Маскевич С. А., Маскевич А. А. // Журн. прикл. спектроскопии. 1987. Т. 47. № 2. С. 335–339.
32. Башарин С. К., Гачко Г. А., Кивач Л. Н., Маскевич С. А., Маскевич А. А., Удовыченко В. Р. // Журн. прикл. спектроскопии. 1990. Т. 52. № 1. С. 48–52.
33. O'Connor D. V., Phillips D. Time-correlated Single Photon Counting. Acad. Press, 1984. 283 p.
34. Voss K., Hock A., Visser A. J. W. G. // *Eur. J. Biochem.* 1987. V. 165. № 1. P. 55–63.
35. Лакович Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии. М.: Мир, 1986. 496 с.

Поступила в редакцию
1.IV.1991

После доработки
23.IX.1991

I. P. CHERNIKEVICH, A. A. MASKEVICH*, G. A. GACHKO*, I. B. ZAVODNIK,
L. N. KIVACH*, S. A. MASKEVICH*, I. L. KOROTAYEVA*

EFFECT OF SUBSTRATES, COFACTORS AND EFFECTORS ON STRUCTURE AND DYNAMICS OF THIAMINE KINASE FROM BREWER'S YEAST

*Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of Belarus,
Grodno*; Ya. Kupala State University, Grodno*

Intrinsic fluorescence as well as fluorescent label (pyridoxal-5'-phosphate) (PLP) and probe (2-(*p*-toluidinylnaphthalene)-6-sulfonate) (TNS) were used to study the effects of substrates (thiamine, Mg-ATP), cofactors (Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+}) and effectors (thiamine phosphate esters, pyruvate, phosphoenol pyruvate, ethyl pyruvate) on the structure and dynamics of thiamine kinase (EC 2.7.6.2) from brewer's yeast. Binding of the ligands to thiamine kinase was shown to be accompanied by quenching of its tryptophane fluorescence, substantial changes in the intensity and light-time as well as by a shift in fluorescence spectra of PLP and TNS. The analysis of the results obtained revealed that thiamine and ATP were bound by the pyrimidine and adenine rings at the hydrophobic region of the enzyme's molecule. Pyruvate has two binding sites: an inhibitory hydrophobic and an activating hydrophilic site, the latter being in a close proximity to the thiamine's binding centre and providing the interaction between the carbonyl group and the substrate. Divalent metal ions raised affinity of the substrates and effectors for thiamine kinase, favouring simultaneously an increase in hydrophobicity of its active site. From the data obtained, a model of the structural organization of the protein's catalytic site is suggested.