



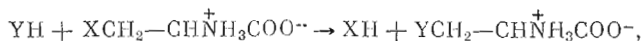
УДК 577.159.02 : 543.422

ВЛИЯНИЕ КОСУБСТРАТОВ НА СПЕКТРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА
ЦИСТАТИОНИН- β -СИНТАЗЫ

Амонтов С. В., Толоса Э. А., Горяченкова Е. В.

Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва

Цистатионин- β -синтаза (КФ 4.2.1.22) — важный фермент метаболизма серосодержащих аминокислот. Дефицит его в организме человека приводит к наследственному заболеванию гомоцистинурии и сосудистой патологии. Фермент относится к группе β -замещающих пиридоксальфосфат-зависимых лиаз, катализирующих реакции типа



где $Y - RS^-$ и SO_3^- , CN^- и др., $X - OH, SH$ и др. К этой группе относятся также цистецилиаза и β -цианоаланинсинтаза [1]. В отличие от α, β -элиминирующих и амбивалентных лиаз β -замещающие лиазы не способны катализировать односубстратные реакции по типу α, β -элиминирования. Таким образом, участие косубстрата в каталитическом акте для β -замещающих лиаз обязательно. Известно, что образование Шиффовых оснований пиридоксальфосфата с аминсубстратом в активном центре фермента обуславливает лабильзацию α -H в субстратной аминокислоте. Было найдено, что у β -замещающих лиаз лабильзация α -H имеет место только в присутствии косубстрата; без косубстрата лабильзация α -H полностью или почти отсутствует [2]. Анализ стационарной кинетики реакций β -замещения убедительно показал, что присоединение субстратов взаимозависимо и протекает по неупорядоченному механизму с образованием тройных комплексов — аминсубстрат-фермент-косубстрат [3]. Эти данные свидетельствуют об определенной роли косубстрата на первых стадиях каталитического акта.

Для выяснения природы этого явления ценную информацию может дать исследование спектральных свойств фермента и его комплексов с субстратами.

Однако в спектрах поглощения β -замещающих лиаз не наблюдали ясно выраженного максимума в области 430 нм, обусловленного протонированным «внутренним» альдимином пиридоксальфосфата с ϵ -аминогруппой лизина активного центра. Для изучения спектральных свойств цистатионин- β -синтазы нами разработан новый способ очистки фермента, позволяющий без добавления пиридоксальфосфата получать достаточные количества очищенного препарата, свободного от избытка кофермента, добавляемого для стабилизации. В этих условиях исключено образование неспецифических альдимinov с ϵ -NH₂-группой остатков лизина, которые могут давать дополнительное поглощение в области 410–430 нм. При изу-

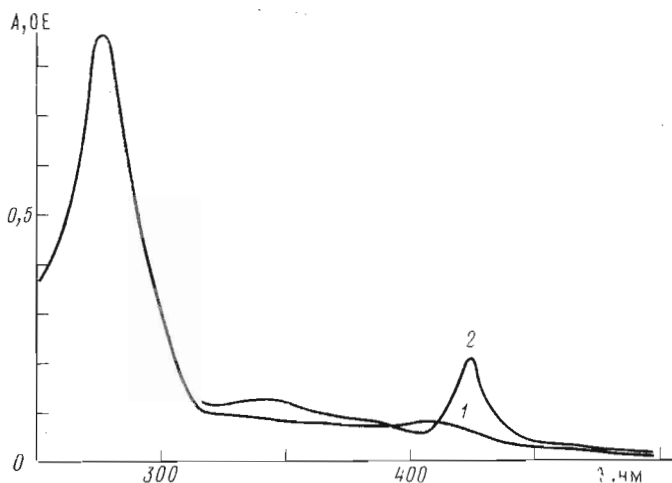


Рис. 1. Спектры поглощения цистатионин- β -синтазы (1 мг/мл, уд. акт. 25 мкмоль H_2S /мг·ч в 0,05 М калий-фосфатном буфере при pH 7,5): 1 — нативный фермент, 2 — нативный фермент + 2-меркаптоэтанол ($2 \cdot 10^{-2}$ М). Активность определяли по образованию H_2S в реакции цистеина (10^{-2} М) с 2-меркаптоэтанолом ($2 \cdot 10^{-2}$ М)

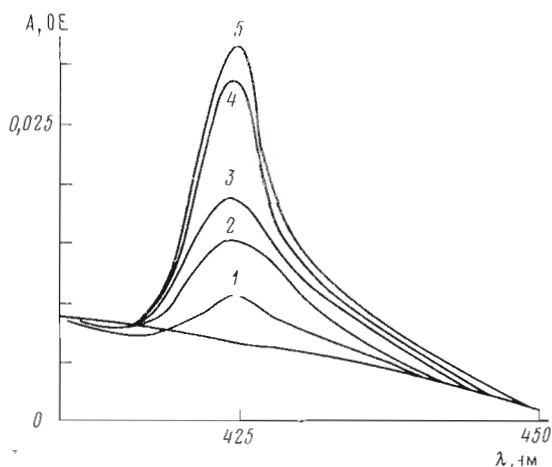


Рис. 2. Изменение величины максимума поглощения при 425 нм в дифференциальном спектре цистатионин- β -синтазы (0,5 мг/мл, уд. акт. 10 мкмоль/мг·ч) при концентрации 2-меркаптоэтанола (М): 1 — $5 \cdot 10^{-3}$; 2 — 10^{-2} ; 3 — $2 \cdot 10^{-2}$; 4 — 10^{-1} ; 5 — $2 \cdot 10^{-1}$

чении спектров поглощения полученных этим способом препаратов цистатионин- β -синтазы, имеющих удельную активность около 70% максимальной, было установлено следующее.

В растворах нативного фермента полоса поглощения в области 430 нм полностью отсутствует (рис. 1, 1). При добавлении к ферменту косубстрата — β -меркаптоэтанола в области 430 нм появляется пик (рис. 1, 2), высота которого возрастает с увеличением концентрации косубстрата и достигает максимальной при концентрации его, насыщающей фермент (рис. 2). Наблюдаемый спектральный эффект обратим. В спектре фермента, освобожденного от косубстрата методом гель-фильтрации, максимум при 430 нм исчезает (с сохранением исходной каталитической активности). Субстраты, не содержащие тиоловой группы, например серин, на спектр поглощения фермента не влияют. При добавлении 2-меркапто-

этанола к апоферменту описанный спектральный максимум не наблюдается.

Полученные данные позволяют предположить, что появление в спектрах максимума в области 430 нм обусловлено образованием фермент-косубстратного комплекса и только в результате этого создаются условия для обнаружения спектра внутреннего протонированного альдимина. Наблюдаемый эффект косубстрата может быть использован в кинетических исследованиях: по высоте максимума при 430 нм можно непосредственно судить о концентрации фермент-косубстратного комплекса. Изменение спектра фермента при насыщении косубстратом позволяет рассчитать величину K_s для фермент-косубстратного комплекса.

Помимо 2-меркаптоэтанола исследовали влияние на спектр поглощения ряда соединений, адекватных в качестве косубстратов (замещающих агентов) данного фермента, а также некоторых нуклеофилов — косубстратов других замещающих лиаз (цианида, сульфита, алкилмеркаптанов). Оказалось, что все эти соединения вызывают в спектрах поглощения фермента изменения, аналогично эффекту β -меркаптоэтанола. При насыщающих концентрациях этих соединений высота максимума при 430 нм не зависит от природы нуклеофила.

Спектр фермента при насыщающих концентрациях β -меркаптоэтанола не зависит от величины рН в пределах 6,8—9,5. В исследованиях зависимости от рН спектров других пиридоксальных ферментов, в частности аспартаттрансаминазы, показано, что при повышении рН исчезает максимум поглощения при 430 нм и появляется новый при 360 нм, что соответствует переходу протонированной формы Шиффова основания кофермента в непротонированную форму. В исследованиях других β -замещающих лиаз (β -цианоаланинсинтазы и серинсульфгидразы дрожжей) влияние косубстрата на спектральные свойства этих ферментов было аналогичным.

ЛИТЕРАТУРА

1. Braunstein A. E., Goryachenkova E. V. Two different modes of synthesis and transformation of cysteine (and related amino acids) by pyridoxal-*p*-dependent lyases.— In: Natural sulfur compounds / Eds Cavallini D., Gaull G., Zappia V., 1980, p. 149—162.
2. Tolosa E. A., Maslova R. N., Goryachenkova E. V., Willhardt I. H., Braunstein A. E. Isotopic hydrogen exchange in reactions catalysed by cysteine lyase and serine sulphhydrase.— Eur. J. Biochem., 1975, v. 53, № 2, p. 429—436.
3. Толоса Э. А., Виллгардт И. Г., Козлов Л. В., Горяченкова Е. В. Стационарная кинетика реакций, катализируемых серинсульфгидразой *Saccharomyces cerevisiae*.— Биохимия, 1979, т. 44, № 2, с. 453—459.

Поступило в редакцию
22.VI.1981

COSUBSTRATE EFFECT ON SPECTRAL PROPERTIES OF CYSTATHIONINE- β -SYNTHASE

AMONTOV S. V., TOLOSA E. A., GORYACHENKOVA E. V.

Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

A cosubstrate effect on the spectral properties of the pyridoxalphosphate-dependent β -substituting lyase, cystathionine- β -synthase, is described. It is shown that the enzyme spectral maximum at 430 nm due to the internal Schiff base appears only in the presence of a cosubstrate or other nucleophiles.