



УДК 577.164.12.04+577.158.013

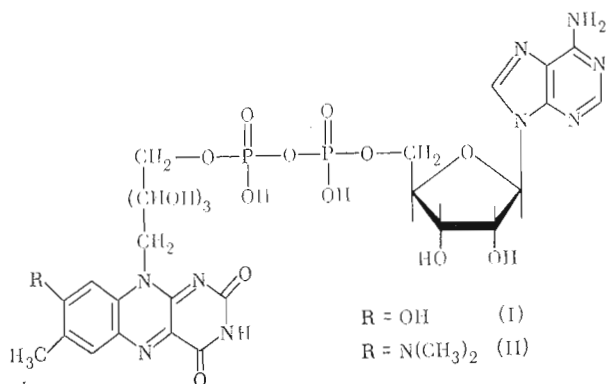
## КОФЕРМЕНТНЫЕ И ИНГИБИТОРНЫЕ СВОЙСТВА АНАЛОГОВ FAD С РАЗЛИЧНЫМИ ЗАМЕСТИТЕЛЯМИ В ПОЛОЖЕНИИ 8 ИЗОАЛЛОКСАЗИНОВОГО КОЛЬЦА

*Цетлин Л. Г., Блинова Н. И., Глебова Г. Д.,  
Литвак Ж. И., Курганов В. И., Березовский В. М.*

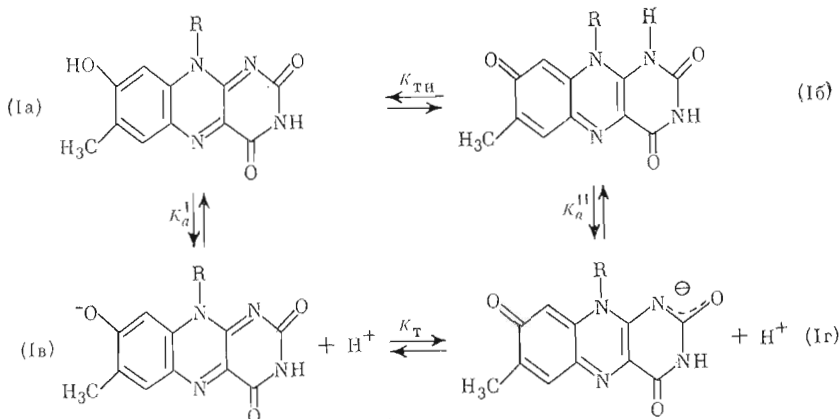
*Всесоюзный научно-исследовательский витаминный институт, Москва*

Впервые установлено, что 8-диметиламино(нор)флавинадениндинуклеотид проявляет коферментные свойства в реакциях, катализируемых FAD-зависимыми оксидоредуктазами животного происхождения: оксидазой *D*-аминокислот из почек свиньи и липоамиддегидрогеназой из сердца свиньи. 8-Окси(нор)флавинадениндинуклеотид выступает в роли конкурентного ингибитора по отношению к FAD в реакции, катализируемой оксидазой *D*-аминокислот. Предложен разностный метод расчета  $pK_a$  одноосновной кислоты по данным спектрофотометрического титрования.

В предыдущих работах нами впервые был осуществлен химический синтез 8-диметиламино(нор)флавинадениндинуклеотида [1] и 8-окси(нор)флавинадениндинуклеотида [2]. Интерес к этим соединениям связан с тем, что 8-диметиламино(нор)рибофлавин обнаружен в штамме *Streptomyces davauensis*, выделенном из филиппинской почвы [3], а 8-окси(нор)флавинадениндинуклеотид входит в структуру простетической группы электропереносящего флавопротеида и NADH-дегидрогеназы из *Megasphaera (Peptostreptococcus) elsdenii* [4, 5]. В настоящей работе изучены ингибиторные и коферментные свойства 8-окси(нор)флавинадениндинуклеотида (I) и 8-диметиламино(нор)флавинадениндинуклеотида (II) в реакциях, катализируемых FAD-зависимыми оксидоредуктазами животного происхождения: оксидазой *D*-аминокислот (КФ 1.4.3.3) из почек свиньи и липоамиддегидрогеназой (КФ 1.6.4.3) из сердца свиньи. Наличие гидрок-



сильной группы в положении 8 изоаллоксазинового кольца соединения (I) приводит к тому, что в области pH 3,5–8 этот аналог находится в виде равновесной смеси ионизированных форм (рис. 1). Возможные равновесия между протонированными и депротонированными формами с учетом таутомерных переходов могут быть представлены следующим образом:



Из рис. 16 следует, что зависимость молярного коэффициента поглощения 8-окси(нор)флавинадениндинуклеотида (I) при 470 нм от pH удовлетворительно описывается теоретическим уравнением (7) (см. «Экспериментальную часть»). соответствующим диссоциации одноосновной кислоты с  $pK_a$  4,9. Сделанный нами ранее вывод при анализе спектров 8-окси(нор)-рибофлавина [6] позволяет предположить, что таутомерное равновесие между протонированными формами сильно сдвинуто в сторону фенольной формы, а таутомерное равновесие в случае депротонированных форм — в сторону образования *n*-бензохиноидной формы. Увеличение pH в этом случае фактически вызовет переход фенольной протонированной формы (Ia) в *n*-бензохиноидную форму (Ic), и измеряемая экспериментально величина  $K_a$  представит собой произведение  $K'_a K_T$  (где  $K'_a = [Ib][H^+]/[Ia]$  и  $K_T = [Ic]/[Ib]$ ). Полученная нами величина  $pK_a$  ионизации C(8)-ОН-группы близка к соответствующей величине для 8-окси(нор)рибофлавина [6].

Известно, что оксидаза *D*-аминокислот способна существовать в виде мономерной и димерной форм, а добавление FAD к апоферменту способствует сдвигу равновесия в сторону образования димера [7]. Проведенные нами эксперименты показали, что зависимость начальной скорости реакции окисления *D*-аланина в присутствии FAD линейна в интервале концентраций фермента от 0,01 до 0,06 мг/мл. Это означает, что в изученных условиях явлениями ассоциации-диссоциации фермента можно пренебречь.

Нами показано, что при добавлении 8-окси(нор)флавинадениндинуклеотида (I) к апоферменту оксидазы *D*-аминокислот окисления *D*-аланина не происходит, т. е. в данном случае этот аналог FAD не обладает коферментными свойствами, однако в этой реакции он выступает в роли конкурентного ингибитора по отношению к FAD. Из данных, представленных на рис. 2, была рассчитана константа Михаэлиса для FAD ( $0,25 \pm 0,02$  мкМ) и константа ингибирования для соединения (I) ( $0,11 \pm 0,02$  мкМ). Максимальная скорость реакции при использовании апофермента в концентрации 0,035 мг/мл составляет  $1,1 \pm 0,03$  мкмоль  $\cdot$  л $^{-1}$   $\cdot$  с $^{-1}$ . Полученные результаты указывают на большее сродство 8-окси(нор)флавинадениндинуклеотида (I) к апоферменту оксидазы *D*-аминокислот по сравнению с FAD. Эта простетическая группа в электронпереносщем flavoпротетине из *Megasphaera elsdenii* может связываться с апоферментом в виде как оксо-, так и оксиформы в зависимости от pH среды [5]. Отсутствие коферментных свойств у 8-окси(нор)флавинадениндинуклеотида (I) в реакции, катализируемой оксидазой *D*-аминокислот, по-видимому, обусловлено *n*-бензохиноидной структурой аниона, преобладающего в растворе при нейтральных и слабощелочных значениях pH.

В отличие от соединения (I) 8-диметиламино(нор)флавинадениндинуклеотид (II) проявляет коферментные свойства в реакции, катализируемой оксидазой *D*-аминокислот.  $K_m$  и  $V$  для соединения (II) составляют  $1,8 \pm 0,2$  мкМ и  $0,82 \pm 0,03$  мкмоль  $\cdot$  л $^{-1}$   $\cdot$  с $^{-1}$  соответственно (рис. 3). Это означает, что при переходе от FAD к 8-диметиламино(нор)флавинаденинди-

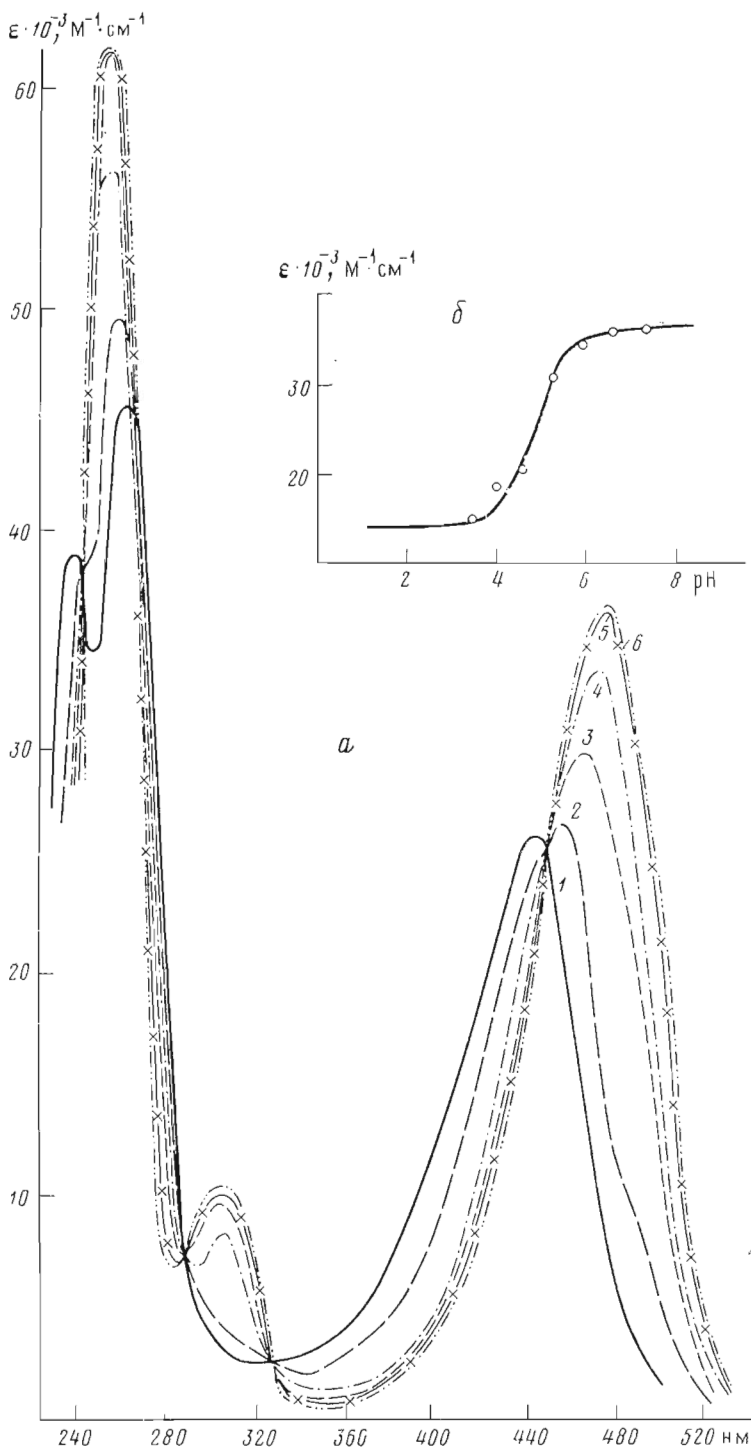


Рис. 1. Спектры поглощения 8-окси(нор)флавинадениндинуклеотида (а) при рН 3,5 (1), 4,6 (2), 5,3 (3), 6 (4), 7,4 (5), 8 (6) и зависимость молярного коэффициента поглощения соединения (1) при 470 нм от рН (б). Точки на графике (б) соответствуют экспериментальным данным, сплошная линия — теоретической кривой, полученной по уравнению (1) с использованием  $\epsilon_1 14 \cdot 10^3 M^{-1} \cdot cm^{-1}$ ,  $\epsilon_2 36 \cdot 10^3 M^{-1} \cdot cm^{-1}$  и  $K_a 13 мкМ$

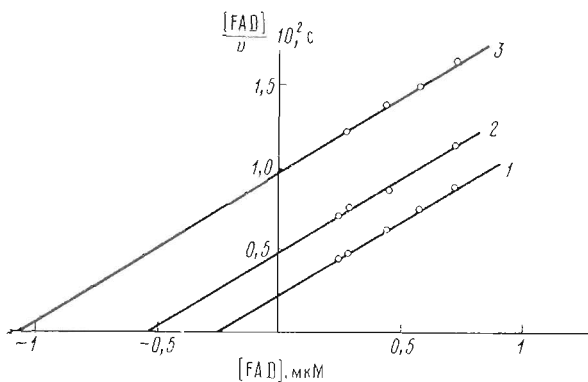


Рис. 2. Зависимость начальной скорости реакции окисления *D*-аланина, катализируемой оксидазой *D*-аминокислот из почек свиньи, от концентрации FAD в присутствии фиксированных концентраций 8-окси(нор)флавинадениндинуклеотида (I): 1 — 0; 2 — 1; 3 — 39 мкМ. Концентрация апофермента 0,035 мк/мл

нуклеотиду (II) наблюдается 7,2-кратное увеличение константы Михаэлиса и 1,3-кратное уменьшение максимальной скорости ферментативной реакции. Замещение метильной группы в положении 8 изоаллоксазинового кольца на SH-группу, как в случае с соединением (II), значительно ослабляет связывание этого аналога с апоферментом оксидазы *D*-аминокислот [8].

При восстановлении липоевой кислоты, катализируемой липоамиддегидрогеназой, 8-диметиламино(нор)флавинадениндинуклеотид (II) также проявляет коферментные свойства. При этом величина  $K_m$  по отношению к липоевой кислоте практически одинакова для холофермента, реконструированного из FAD или соединения (II), и составляет  $3,1 \pm 0,2$  мМ (рис. 4). Обнаружение коферментной активности 8-диметиламино(нор)-флавинадениндинуклеотида (II) при связывании с апоферментами животного происхождения — оксидазой *D*-аминокислот и липоамиддегидрогеназой указывает на возможность выполнения этим соединением функции переносчика электронов в флавопротеиде из *Streptomyces davawensis*.

Таким образом, 8-диметиламино(нор)флавинадениндинуклеотид может функционировать в качестве кофактора оксиредуктаз животного и микробного происхождения.

### Экспериментальная часть

Для анализа рН-зависимости спектров поглощения соединения (I) использовали следующее уравнение, соответствующее диссоциации одноосновной кислоты:

$$\varepsilon = \frac{\varepsilon_2 + \varepsilon_1 ([H^+]/K_a)}{1 + [H^+]/K_a}, \quad (1)$$

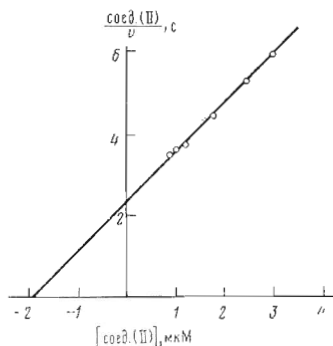
где  $\varepsilon$  — экспериментально измеряемое значение молярного коэффициента поглощения,  $\varepsilon_1$  и  $\varepsilon_2$  — молярные коэффициенты поглощения протонированной и депротонированной форм соответственно,  $K_a$  — константа диссоциации протонированной формы. Если экспериментальные данные позволяют одновременно определить величины  $\varepsilon_1$  и  $\varepsilon_2$  (экстраполяцией значений  $\varepsilon$  к низким и высоким значениям рН соответственно), то константу  $K_a$  находят по формуле

$$K_a = (\varepsilon - \varepsilon_1) [H^+] / (\varepsilon_2 - \varepsilon). \quad (2)$$

Если известна только величина  $\varepsilon_1$ , то значения  $K_a$  и  $\varepsilon_2$  рассчитывают при помощи следующей линейной анаморфозы:

$$\varepsilon = \varepsilon_2 - \frac{1}{K_a} (\varepsilon - \varepsilon_1) [H^+]. \quad (3)$$

Рис. 3. Зависимость начальной скорости реакции окисления *D*-аланина, катализируемой оксидазой *D*-аминокислот, от концентрации 8-диметиламино(шор)флавинадениндинуклеотида (II). Концентрация апофермента 0,035 мг/мл



При известной величине  $\varepsilon_2$  константы  $K_a$  и  $\varepsilon_1$  находят при помощи выражения

$$\varepsilon = \varepsilon_1 + K_a(\varepsilon_2 - \varepsilon)/[\text{H}^+]. \quad (4)$$

Если экспериментальные данные не позволяют оценить значений  $\varepsilon_1$  и  $\varepsilon_2$ , для расчета трех параметров уравнения (1) может быть применен «разностный метод» [9]. Выберем на кривой зависимости  $\varepsilon$  от pH две точки с координатами  $\{D'; \text{pH}'\}$  и  $\{D; \text{pH}\}$  с таким расчетом, чтобы концентрации  $[\text{H}^+]$ , соответствующие этим точкам, различались на постоянный множитель  $\kappa$ , больший 1, а именно  $[\text{H}^+] = \kappa[\text{H}^+]$ . Расстояние между точками по оси pH составляет, очевидно,  $\lg \kappa$ . Если мы располагаем набором подобных пар точек, то для нахождения параметров  $\varepsilon_2$  и  $K_a$  может быть использована следующая анаморфоза:

$$\frac{\kappa(\varepsilon - \varepsilon')}{(\kappa - 1)} = \varepsilon_2 - \frac{1}{K_a} \cdot \frac{\kappa(\varepsilon - \varepsilon')[\text{H}^+]}{(\kappa - 1)}. \quad (5)$$

Зависимость  $(\kappa\varepsilon - \varepsilon')/(\kappa - 1)$  от  $\kappa(\varepsilon - \varepsilon')[\text{H}^+]/(\kappa - 1)$  может быть построена с различными значениями  $\kappa$ . Наклон прямой составляет  $-1/K_a$ , а отрезок, отсекаемый на оси ординат,  $-\varepsilon_2$ . Определив  $\varepsilon_2$  и  $K_a$ , рассчитываем коэффициент экстинкции  $\varepsilon_1$  по формуле  $\varepsilon_1 = \varepsilon - K_a(\varepsilon_2 - \varepsilon)/[\text{H}^+]$ . Для определения значений  $\varepsilon_1$ ,  $\varepsilon_2$  и  $K_a$  в случае соединения (I) применяли линейные анаморфозы (4) и (5).

Оксидазу *D*-аминокислот (Reanal, ВНР) очищали с помощью хроматографии на гидроксипатите с использованием ступенчатого градиента пирофосфатного буфера [10]. Получаемый при этом фермент является гомогенным по данным седиментации в аналитической ультрацентрифуге «Spinco», модель E (Beckman, Австрия) и электрофореза в полиакриламидном геле и имеет в 35–40 раз более высокую удельную активность, чем коммерческий препарат.

Апофермент оксидазы *D*-аминокислот получали с помощью, диализа раствора холофермента против 1 М раствора КВг по методу, предложенному авторами работы [11]. Полноту удаления FAD контролировали спектрофотометрически по отсутствию поглощения при 460 нм. Выход апофермента составлял практически 100%.

Апофермент липоамиддегидрогеназы получали, отделяя FAD от холофермента липоамиддегидрогеназы из сердца свиньи (Boehringer, ФРГ), по методике, предложенной в работе [12]. Фермент (4,8 мг/мл) в 0,1 М фосфатном буфере (pH 7,6) инкубировали 2 мин с 5 М хлоридом гуанидина и для отделения апофермента раствор пропускали через колонку с сефадексом G-25. Выделенные фракции белка не обладали ферментативной активностью. Для получения холофермента липоамиддегидрогеназы раствор апофермента (0,68 мг/мл) инкубировали 24 ч при 20° С с FAD (7 мМ) или соединением (II) (3,2 мМ).

Ферментативную активность липоамиддегидрогеназы определяли в фосфатном буфере при pH 7,6 по изменению поглощения реакционной смеси при 340 нм, используя 0,11 мг/мл липоамиддегидрогеназы, 0,1 мМ NADH и 0,21 мМ NAD.

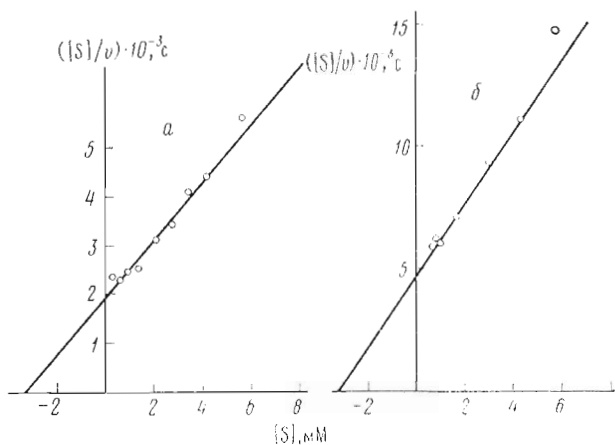


Рис. 4. Зависимость начальной скорости реакции восстановления липоевой кислоты в реакции, катализируемой липоамиддегидрогеназой, реконструированной с FAD (а) и с 8-диметиламино (нор)флавинадениндинуклеотидом (II) (б)

Концентрации апо- и холофермента оксидазы *D*-аминокислот определяли либо по методу Лоури, либо используя коэффициент поглощения при 280 нм  $(1,4$  и  $1,6$  (мг/мл) $^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$  соответственно) [13]. Концентрации компонентов в реакционной смеси при определении ферментативной активности составляли: каталазы — 0,8 мг/мл, NADH — 0,16 мМ, лактатдегидрогеназы (из скелетных мышц свиньи, препарат фирмы «Reanal», ВНР) — 0,10 мг/мл, *D*-аланина — 20 мМ (насыщающая концентрация), апофермента оксидазы *D*-аминокислот — 0,035 мг/мл. После 15 мин инкубации апофермента и FAD при 30° С в 0,016 М пирофосфатном буфере, рН 8,5, реакцию начинали добавлением раствора *D*-аланина. При испытании ферментной активности соединения (II) апофермент предынкубировали с этим аналогом. При испытании ингибиторной активности соединения (I) и апофермент предынкубировали с этим аналогом и FAD. Специальные опыты показали, что 15-минутной инкубации достаточно для установления равновесия в системе апофермент + FAD (или соединение (II))  $\rightleftharpoons$  комплекс. Начальную скорость ферментативной реакции окисления *D*-аланина определяли как тангенс угла наклона касательной к начальному участку кинетической кривой, регистрацию которой проводили по изменению оптического поглощения при 340 нм с использованием спектрофотометра SP 800 «Pye Unicam» (Англия). Зависимость скорости реакции от концентрации одного из субстратов изучали в условиях насыщения по второму субстрату. Константу Михаэлиса и максимальную скорость в случае FAD и соединения (II) рассчитывали путем представления кинетических данных в координатах Эди — Хофсти по формуле

$$\frac{[S]}{v} = \frac{K_m}{V} + \frac{1}{V} [S]. \quad (6)$$

Отрезок, отсекаемый прямой на оси абсцисс, равен  $K_m$ , а наклон —  $1/V$ . Константу ингибирования для соединения (I) рассчитывали при помощи соотношения  $K_{m(\text{каж})} = K_m(1 + [I]/K_I)$ , где  $K_{m(\text{каж})}$  — кажущаяся константа Михаэлиса в присутствии ингибитора,  $[I]$  — концентрация ингибитора.

8-Диметиламино (нор) флавинадениндинуклеотид и 8-окси (нор) флавинадениндинуклеотид были синтезированы и охарактеризованы в работах [1] и [2] соответственно.

Авторы выражают благодарность П. В. Калмыкову за проведение экспериментов по седиментации в аналитической ультрацентрифуге и В. М. Гуревичу за участие в обсуждении результатов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Литвак Ж. И., Березовский В. М. Синтез 8-диметиламино(нор)флавинадениндинуклеотида.— Биоорг. химия, 1979, т. 5, № 1, с. 47–55.
2. Глебова Г. Д., Березовский В. М. Синтез и таутомерия 8-окси(нор)флавинадениндинуклеотида.— Биоорг. химия, 1981, т. 7, № 2, с. 236–239.
3. Otani S., Takatsu M., Nakano M., Kasai S., Miura K., Matsui R. Roseoflavin, a new antimicrobial pigment from *Streptomyces*.— J. Antibiot., 1974, v. 27, № 1, p. 88–89.
4. Ghisla S., Mayhew S. G. Identification and structure of a novel flavin prosthetic group associated with reduced nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase from *Peptostreptococcus elsdenii*.— J. Biol. Chem., 1973, v. 248, № 18, p. 6568–6570.
5. Ghisla S., Mayhew S. G. Identification and properties of 8-hydroxyflavin adenine dinucleotide in an electron-transferring flavoprotein from *Peptostreptococcus elsdenii*.— Eur. J. Biochem., 1976, v. 63, p. 373–390.
6. Глебова Г. Д., Кириллова Н. П., Березовский В. М. Исследование в ряду алло- и изоаллоксазина. II. Синтез и таутомерия 8-окси(нор)рибофлавина.— Ж. общ. химии, 1979, т. 48, с. 2547–2551.
7. Tanaka F., Yagi K. Cooperative binding of coenzyme in *D*-amino acid oxidase.— Biochemistry, 1979, v. 18, № 8, p. 1531–1536.
8. Massey V., Ghisla S., Moore E. G. 8-Mercaptoflavins as active site probes of flavoenzymes.— J. Biol. Chem., 1979, v. 254, № 19, p. 9640–9650.
9. Курганов Б. И., Яковлев В. А. Разностный метод решения трех параметрических уравнений в ферментативной кинетике.— Мол. биол., 1970, т. 4, № 5, с. 781–789.
10. Jenkins W., Behlen A., Rogers P. A simplified procedure for isolation of pig kidney *D*-amino acid oxidase.— Anal. biochem., 1979, v. 94, № 1, p. 105–108.
11. Massey V., Curti B. A new method of preparation of *D*-amino acid oxidase apoprotein and a conformational change after its combination with flavin adenine dinucleotide.— J. Biol. Chem., 1966, v. 241, № 14, p. 3417–3423.
12. Moore E. G., Cardemil E., Massey V. Production of a covalent flavin linkage in lipoamide dehydrogenase. Reaction with 8-Cl-FAD.— J. Biol. Chem., 1978, v. 253, № 18, p. 6413–6422.

Поступила в редакцию  
27.IV.1981

### COENZYME AND INHIBITORY PROPERTIES OF FAD ANALOGS WITH DIFFERENT SUBSTITUENTS AT 8-POSITION OF ISOALLOXAZINE RING

TSETLIN L. G., KLINOVA N. I., GLEBOVA G. D., LITVAK J. I.,  
KURGANOV B. I., BEREZOVSKII V. M.

*All-Union Institute for Vitamin Research, Moscow*

It has been shown that 8-dimethylamino(nor)flavin adenine dinucleotide acts as coenzyme in the reactions catalyzed by FAD-dependent mammalian oxidoreductases, *D*-amino acid oxidase from pig kidney and lipoamide dehydrogenase from pig heart. 8-Hydroxy(nor)flavin adenine dinucleotide inhibits *D*-amino acid oxidase competitively with respect to FAD. A difference method is suggested for calculation of  $pK_a$  value of a monobasic acid from spectrophotometric titration data.