



УДК 577.153.3; 577.150.4

## О ВЗАИМОДЕЙСТВИИ СПИН-МЕЧЕННЫХ ИНГИБИТОРОВ С АСПАРТАТ-АМИНОТРАНСФЕРАЗОЙ \*

*Мишарин А. Ю., Ажаев А. В., Тимофеев В. П.,  
Поляновский О. Л.*

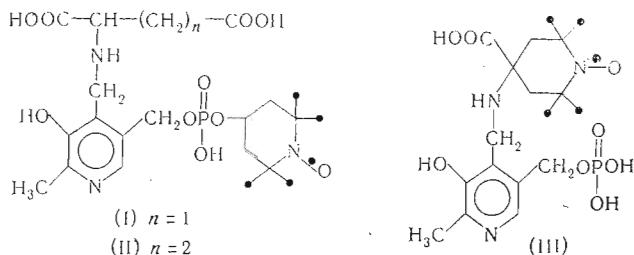
*Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва*

Для изучения активного центра фосфопиридоксалевого фермента *L*-аспартат-α-кетоглутарат-аминотрансферазы (КФ 2.6.1.1) использованы производные витамина B<sub>6</sub>, содержащие парамагнитную метку. Установлено, что спин-меченые производные витамина B<sub>6</sub> обладают высоким сродством к апоферменту, а также к холоферменту, являясь эффективными конкурентными ингибиторами холофермента. Спектры ЭПР комплексов холофермента с ингибиторами указывают на «слабую степень иммобилизации» спин-метки. Спектральные и ингибиторные свойства комплексов спин-меченых производных с ферментом позволяют сделать вывод о существенной роли субстратоподобной части при связывании спин-меченых аналогов с ферментом. При взаимодействии с ферментом эквимольных количеств спин-меченых производных витамина B<sub>6</sub> наблюдается необратимое исчезновение сигнала ЭПР, обусловленное восстановлением иминоксильного радикала в активном центре тиоловой группой цистеинового остатка. Окислительно-восстановительная реакция иминоксильного фрагмента спин-меченого производного витамина B<sub>6</sub> с тиоловой группой происходит лишь при специфическом связывании молекулы аналога с белком, что позволяет оценить расстояние между тиоловой группой остатка цистеина и катионным центром связывания карбоксильной группы аналога в молекуле фермента.

Исследование ферментов с помощью спин-меченых соединений, обладающих специфическим сродством к активному центру, является удобным методом изучения топографии последнего. Перспективность подобного подхода к изучению пространственных соотношений в области активного центра и механизма ферментативных реакций убедительно показана на многих примерах [1].

Ранее нами было установлено, что спин-меченые аналоги витамина B<sub>6</sub> специфически реагировали с активным центром аспартат-аминотрансферазы (КФ 2.6.1.1.); связывание этих аналогов приводило к исчезновению парамагнитного центра и сопровождалось окислением тиоловой группы частично маскированного остатка цистеина [2].

В настоящей работе для изучения аспартат-аминотрансферазы использованы спин-меченые производные витамина B<sub>6</sub>, содержащие субстратоподобный фрагмент:



\* Сокращения: ПДФ — пиридоксаль-5'-фосфат, КМ — карбоксиметил, ПХМБ — *n*-хлормеркурибензоат.

Связывание (I), (II) и (III) в активном центре фермента. При взаимодействии апотрансаминазы с коферментом или его синтетическим производным в спектре КД возникает характерный максимум, индуцируемый асимметрическим окружением хромофора [3, 4]. Поэтому для изучения связывания спин-меченых соединений (I) — (III) с апоферментом были использованы спектры КД комплексов апотрансаминазы с этими ингибиторами (рис. 1, а). Полное связывание соединений (I) — (III) происходит

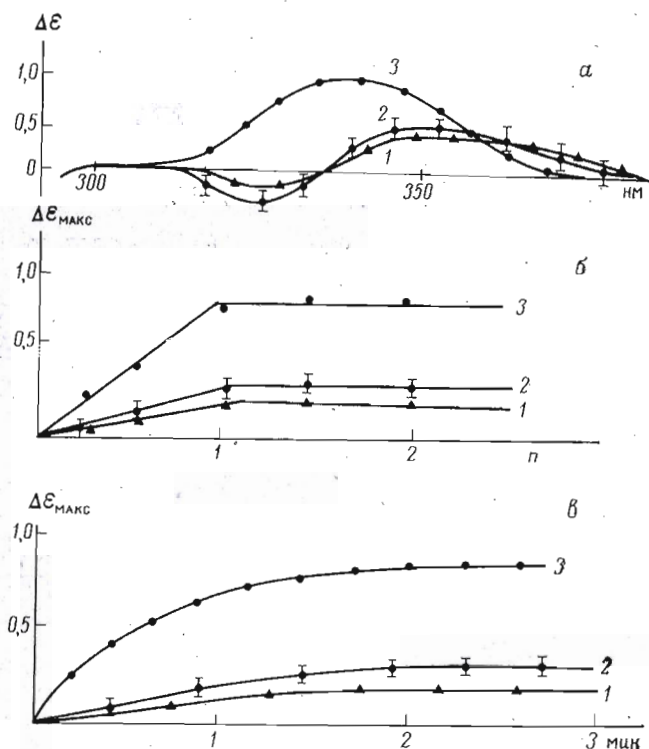


Рис. 1. Взаимодействие соединений (I) — (III) (кривые 1—3) с апотрансаминазой при pH 5,2; а — спектры КД; б — зависимость прироста  $\Delta\epsilon$  в максимуме КД от отношения концентраций [аналог]/[апотрансаминаза] =  $n$ ; в — зависимость прироста  $\Delta\epsilon$  в максимуме КД от времени инкубирования аналога с апоферментом при двукратном избытке аналога. Концентрация апотрансаминазы  $3 \cdot 10^{-4}$  М

при соотношении апофермент:аналог, близком к эквимолярному (рис. 1, б). Характерная полоса в спектре КД, указывающая на образование комплекса апотрансаминазы — аналог, достигает своего максимального значения в течение 2—3 мин (рис. 1, в).

Наличие оптически активных полос в спектрах комплексов апотрансаминазы с соединениями (I) — (III) указывает на асимметрическое окружение пиридоксаминового цикла. Молярные коэффициенты эллиптичности ( $\Delta\epsilon$ ) комплексов, представленных на рис. 1, а, существенно ниже, чем для альдиминной и аминной форм фермента [3] (соответственно  $\Delta\epsilon_{430}$  15,  $\Delta\epsilon_{340}$  7), а также меньше, чем для комплекса апотрансаминазы со спин-меченым аналогом пиридоксаминфосфата [2] ( $\Delta\epsilon_{340}$  1,9).

Следующая задача состояла в изучении специфичности взаимодействия соединений (I) — (III) с апоферментом. С этой целью мы провели взаимодействие комплексов апотрансаминазы — аналог с естественным коферментом — ПДФ при pH 5,2; при этом значения pH «нормальному» связыванию кофермента соответствует характерный пик в спектрах поглощения с  $\lambda_{\text{макс}}$  430 нм [3] (рис. 2, а).

Оказалось, что ПЛФ вытесняет из комплекса с апоферментом любой из аналогов (при соотношении концентраций апофермента и аналога 1 : 1). При этом спектр поглощения в видимой области становится идентичным спектру нативного холофермента, спектр КД приближается к спектру КД нативной аспартат-аминотрансферазы (рис. 2). Холофермент, реконструированный добавлением ПЛФ к комплексу апотрансаминазы с аналогом, восстанавливает большую часть своей исходной активности (см. ниже).

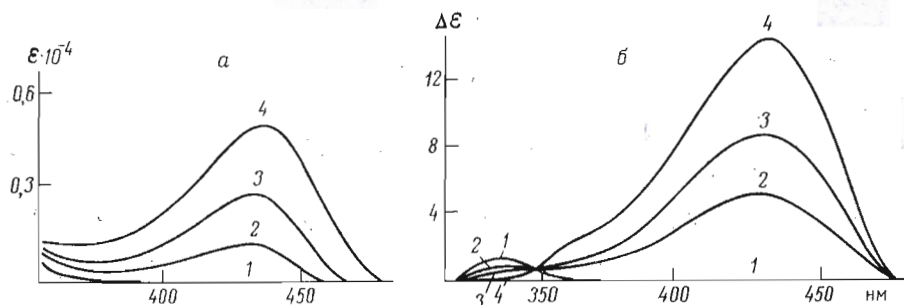


Рис. 2. Взаимодействие ПЛФ с комплексом апотрансаминазы — (III) при pH 5,2: а — спектры поглощения; б — спектры КД. Концентрация апотрансаминазы  $5 \cdot 10^{-5}$  М, (III),  $5 \cdot 10^{-3}$  М; 1 — комплекс апотрансаминазы — (II); 2–4 — то же в присутствии ПЛФ; 2 — концентрация ПЛФ  $1,25 \cdot 10^{-5}$  М; 3 — ПЛФ,  $2,5 \cdot 10^{-5}$ ; 4 — ПЛФ,  $5 \cdot 10^{-5}$  М (Для комплексов соединений (I) — (III) спектры идентичны)

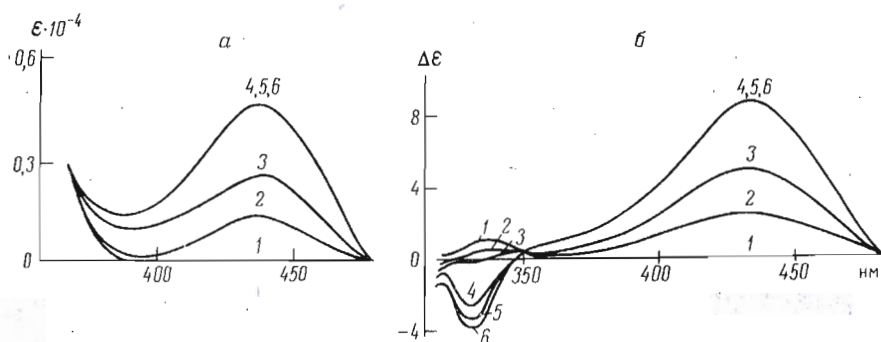


Рис. 3. Взаимодействие ПЛФ с апотрансаминазой в присутствии избытка (III) при pH 5,2; а — спектры поглощения; б — спектры КД. Концентрация апотрансаминазы  $5 \cdot 10^{-5}$  М, (III) —  $5 \cdot 10^{-4}$  М. 1 — в отсутствие ПЛФ; 2–4 — в присутствии ПЛФ; 2 — концентрация ПЛФ  $1,25 \cdot 10^{-5}$  М; 3 — ПЛФ,  $2,5 \cdot 10^{-5}$  М; 4 — ПЛФ,  $5 \cdot 10^{-5}$  М; 5 и 6 — спектры апотрансаминазы ( $5 \cdot 10^{-5}$  М) в присутствии ПЛФ ( $5 \cdot 10^{-5}$  М) и соответственно (I) ( $5 \cdot 10^{-4}$  М) и (II) ( $5 \cdot 10^{-4}$  М)

В следующих опытах отношения между соединениями (I) — (III) и ПЛФ испытывали при избытке аналогов. В одной серии опытов ПЛФ добавляли к комплексу апотрансаминазы — аналог в присутствии избытка аналога (рис. 3, а, б), а в другой серии опытов подвергали титрованию аналогами нативный холофермент в пиридоксалиденовой форме (рис. 4, а, б).

И в том, и в другом случае резко изменяется фактор анизотропии (при том же значении поглощения),  $(\Delta\epsilon/\epsilon)$  (430)  $14 \cdot 10^{-4}$ . Кроме того, наличие отрицательного экстремума при  $\lambda$  328 нм, т. е. в максимуме поглощения аналога, свидетельствует о том, что пиридоксаминный цикл соединений (I) — (III) находится в белковом окружении.

Таким образом, при взаимодействии соединений (I) — (III) с холоферментом или же при добавлении ПЛФ к комплексу аналога с апоферментом наблюдается образование тройного комплекса: апофермент — кофермент — аналог. Из спектров КД следует, что в связывании с холофермен-



том участвует пиридоксаминовый цикл соединений (I)–(III) (максимум КД при  $\lambda$  328 нм). Оставалось выяснить роль карбоксильной группы субстратоподобной части соединений (I)–(III) в связывании с аспарат-аминотрансферазой.

*Ингибирование аспарат-аминотрансферазы соединениями (I)–(III).* Мы обнаружили, что соединения (I), (II) или (III) препятствуют образованию комплекса аспарат-аминотрансферазы с  $\beta$ -эритрооксинаспарагиновой кислотой (аналогом субстрата). Известно [5, 6], что  $\beta$ -эритрооксинаспарагиновая кислота специфически взаимодействует с аспарат-амино-

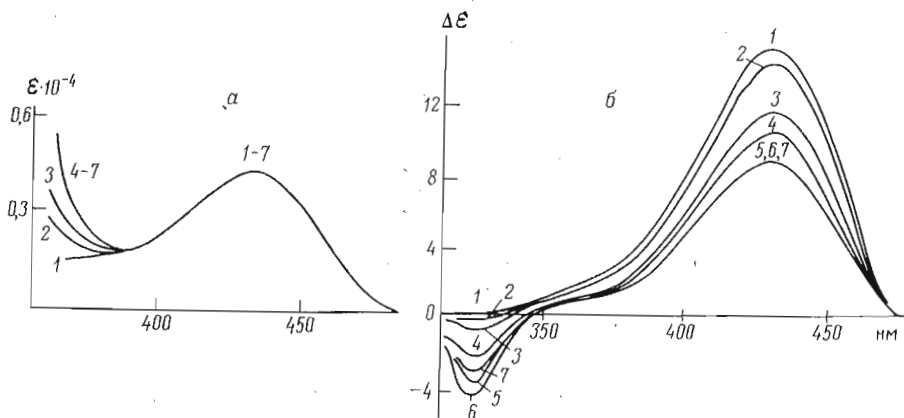


Рис. 4. Взаимодействие аспарат-аминотрансферазы с (I) при pH 5,2; а – спектры поглощения; б – спектры КД. Концентрация холофермента  $5 \cdot 10^{-5}$  М, 1 – аспарат-аминотрансфераза; 2–4 – то же в присутствии (I)–(III); 2 – (II),  $5 \cdot 10^{-5}$  М; 3 – (I),  $1,25 \cdot 10^{-4}$  М; 4 – (I),  $2,5 \cdot 10^{-4}$  М; 5–7 – спектры холофермента в присутствии соответственно (I)–(III) в концентрации  $5 \cdot 10^{-4}$  М

трансферазой, быстро образуя промежуточное соединение семихиноидного типа с максимумом поглощения 492 нм и медленно участвуя в реакции переаминирования. В присутствии соединений (I)–(III) интенсивность длинноволнового максимума комплекса  $\beta$ -эритрооксинаспарагиновой кислоты с ферментом сильно снижается (рис. 5). Все три соединения являются эффективными ингибиторами переаминирования природных субстратов. Первоначальное резкое снижение активности (на 30%) при эквимольном соотношении фермент: аналог является результатом необратимой модификации SH-группы активного центра (о модификации см. ниже). Однако дальнейшее торможение трансаминазной активности, происходящее при увеличении концентрации аналога, показывает, что соединения (I)–(III) имеют высокое сродство и к модифицированному ферменту.

Для определения типа ингибирования фермента спин-мечеными производными витамина  $B_6$  было использовано построение графика в координатах двойных обратных величин [7]. В опыте измеряли начальную скорость переаминирования *L*-аспарагиновой кислоты в присутствии  $\alpha$ -кетоглутаровой кислоты и спин-меченого аналога. Измерения проводили для разных концентраций *L*-аспарагиновой кислоты при постоянных концентрациях  $\alpha$ -кетоглутаровой кислоты и спин-меченых производных. На рис. 6 приведены зависимости начальной скорости переаминирования от концентрации аспарагиновой кислоты для нативного фермента, фермента, предварительно модифицированного окислением (о модификации см. ниже), и того же фермента в присутствии аналогов.

Для определения констант ингибирования ( $K_i$ ) для соединений (I)–(III) был использован графический метод Диксона [7]. Об ингибирующей способности аналога судили по изменению скорости ферментативного превращения *L*-аспарагиновой кислоты в щавелевоуксусную кислоту в при-

сутствии  $\alpha$ -кетоглутаровой кислоты в зависимости от концентрации парамагнитного аналога. Значения  $K_1$  для всех трех соединений лежат в пределах  $(1 \div 2) \cdot 10^{-6}$ . Полученный результат, доказывающий конкурентные отношения субстрата и соединений (I)–(III), свидетельствует о роли «субстратоподобного» участка в образовании комплекса холофермент — аналог и о влиянии на связывание этих соединений с субстратной площадью холофермента.

*Химическая модификация аспаргат-аминотрансферазы радикалами (I)–(III).* Ранее нами было показано, что спин-меченые аналоги кофермента восстанавливаются при взаимодействии с апотрансаминазой, на что указывало необратимое исчезновение сигнала ЭПР [2]. Спин-меченые производные витамина  $B_5$  соединений (I)–(III) реагируют с апоферментом аналогичным образом: исчезновение сигнала ЭПР происходит при эквимолярном соотношении апотрансаминаза : аналог (рис. 7), действие агентов, денатурирующих белок, не приводит к восстановлению сигнала. Исчезновение парамагнитного центра аналога сопровождается модификацией одной тиоловой группы белка (показано титрованием по Бойеру [8]). Остаток цистеина, участвующий в реакции с иминоксидом, локализован в области активного центра и является доступным для синкаталитической модификации, на что указывают результаты следующих опытов.

Во избежание возможности модификации радикалами (I)–(III) внешних остатков цистеина в ферменте (Cys-45 и Cys-82) последние были предварительно защищены карбоксиметилированием [9]. Однако и после этого связывание соединений (I)–(III) с апоферментом также приводило к модификации одного остатка цистеина.

Последующая обработка N-этилmaleинимидом (N-EM) в присутствии субстратов карбоксиметилированной апотрансаминазы [9], предварительно модифицированной эквимолярным количеством спин-меченых аналогов и затем инкубированной с ПЛФ, не приводит к дополнительному блокированию тиоловых групп и незначительно инактивирует фермент в отличие от результатов такой обработки нативного фермента (см. таблицу).

Взаимодействие нативной аспаргат-аминотрансаминазы и спин-меченых ингибиторов (I)–(III) также приводит к исчезновению сигнала ЭПР и сопровождается модификацией тиоловой группы активного центра; по-видимому, при образовании специфического комплекса аналога с холоферментом.

*Возможность «синкаталитического» окисления тиоловой группы иминоксильным радикалом.* Чтобы проверить, возможна ли реакция между частично маскированным остатком цистеина и иминоксильной группой, не обладающей специфическим сродством к ферменту, мы инкубировали КМ-аспаргат-аминотрансферазу с 2,2,6,6-тетраметил-1-оксил-4-оксипиридином (IV). Без добавления субстратов практически не происходит восста-

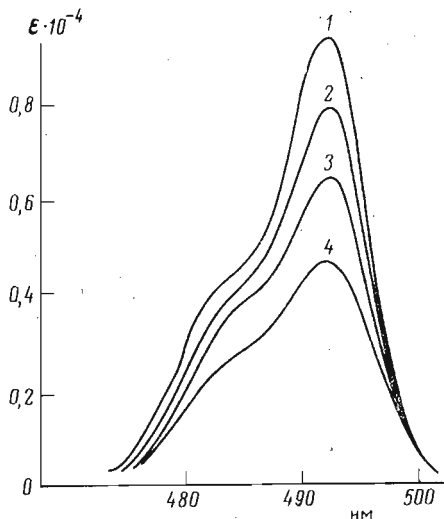


Рис. 5. Взаимодействие  $\beta$ -эритрооксиаспарагиновой кислоты с аспаргат-аминотрансферазой в присутствии (I) и (II) при pH 8,7. Концентрация фермента  $3 \cdot 10^{-5}$  M,  $\beta$ -эритрооксиаспарагиновой кислоты  $0,8 \cdot 10^{-3}$  M. Спектры записаны через 60 с после смешивания. 1 — в отсутствие аналога; 2 — в присутствии (I) ( $10^{-4}$  M); 3 — в присутствии (I) ( $2 \cdot 10^{-4}$  M); 4 — в присутствии (II) ( $5 \cdot 10^{-4}$  M)

новления (IV), однако в присутствии субстратов реакция восстановления идет (рис. 8). Свойства препарата фермента, обработанного радикалом (IV) в присутствии субстратов, идентичны свойствам аспарат-аминотрансферазы, обработанной аналогами (I)–(III) (см. таблицу). Скорость восстановления (IV) в присутствии субстратов подчиняется экспоненциальной зависимости от времени и характеризует неспецифическое взаимодействие радикала с образующимся фермент-субстратным комплексом (рис. 8). Скорости восстановления радикалов (I)–(III) существенно

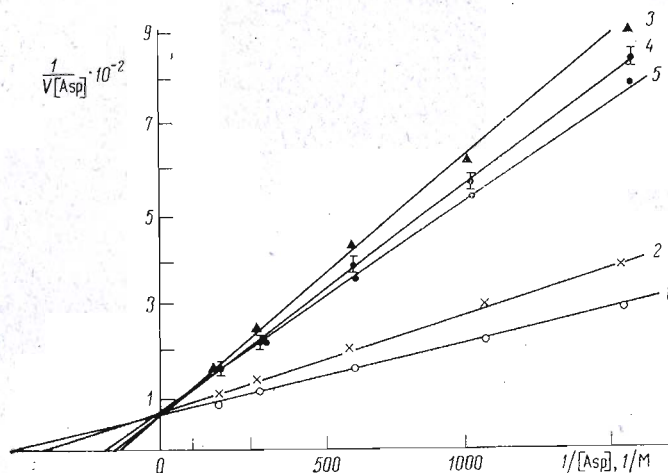


Рис. 6. Зависимость скорости переаминирования *L*-аспарагиновой кислоты с  $\alpha$ -кетоглутаровой кислотой в присутствии (I)–(III) при pH 8,3. Концентрация аспарат-аминотрансферазы  $6,7 \cdot 10^{-9}$  М, аналогов  $2 \cdot 10^{-6}$  М. Концентрация  $\alpha$ -кетоглутаровой кислоты  $6,7 \cdot 10^{-3}$  М. 1 — нативная аспарат-аминотрансфераза; 2 — фермент, предварительно модифицированный окислением цистеинового остатка (см. таблицу); 3–5 — тот же фермент в присутствии аналогов соответственно (I)–(III)

выше, в случае взаимодействия апофермента с радикалом (III) скорость восстановления равна скорости образования комплекса апотрансаминаза — соединение (III). Эти данные указывают на то, что модификация тиолового остатка соединениями (I)–(III) происходит под действием радикала, специфически взаимодействующего с активным центром.

**Спектры ЭПР.** Как показано выше, при взаимодействии спин-меток (I)–(III) с активным центром аспарат-аминотрансферазы происходит полное необратимое исчезновение сигнала ЭПР, если концентрация этих соединений равна концентрации активных центров. Модификация актив-

#### Модификация активного центра радикалами (I)–(IV)

Препарат	Актив-ность, %	Число SH-групп *	После инкубирования с N-EM в присутствии субстрата	
			актив-ность, %	число SH-групп *
Аспарат-аминотрансфераза	100	4,2	3–4	1,0
KM-аспарат-аминотрансфераза	105–107	2,0	0–3	1,1
KM-аспарат-аминотрансфераза, модифицированная (I), (II), (III) или (IV) в присутствии субстратов	70	1,1	30–38	0,9

\* Титруемых ПХМБ в присутствии 1% раствора додецилсульфата натрия.



ного центра радикалом приводит лишь к 30%-ной инактивации, однако, как показали опыты по ингибированию, аналоги обладают сродством и к модифицированному ферменту. Поэтому при избытке любого из аналогов в равновесной смеси комплекса аспартат-аминотрансфераза — аналог в спектре ЭПР появляется иммобилизованная компонента, отвечающая комплексу модифицированная аспартат-аминотрансфераза — аналог. На рис. 9 представлены спектры ЭПР комплексов аспартат-аминотрансферазы с соединениями (I) — (III) при 10-кратном молярном избытке спин-меток.

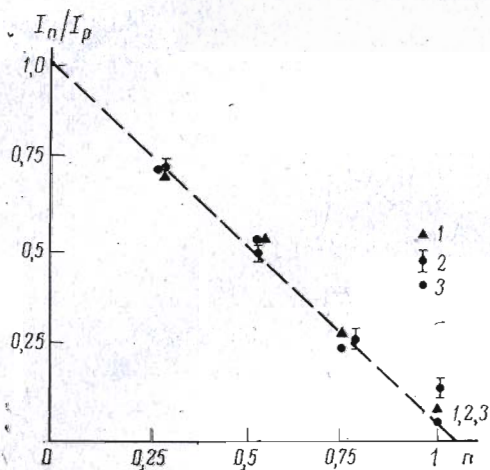


Рис. 7

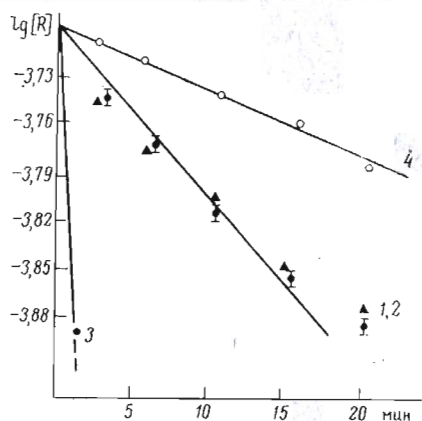


Рис. 8

Рис. 7. Изменение амплитуды центральной компоненты спектра ЭПР спин-меток (I) — (III) (1—3) при взаимодействии с апотрансаминазой.  $I_p$  — амплитуда центральной компоненты спектра ЭПР свободной метки,  $I_n$  — амплитуда центральной компоненты спектра в присутствии апотрансаминазы;  $n$  — отношение концентраций [апотрансаминаза]/[спин-метка]. Концентрация апотрансаминазы  $2 \cdot 10^{-4}$  М

Рис. 8. Скорость уменьшения амплитуды спектра ЭПР соединений (I) — (IV) при взаимодействии с белком при pH 8,3. (Полулогарифмическая зависимость. Концентрация ингибиторов в системе определена сравнением амплитуды сигнала ЭПР со стандартным эталоном.) Концентрация белка  $10^{-4}$  М, ингибиторов  $2 \cdot 10^{-4}$  М. 1 — КМ-апотрансаминаза + (I); 2 — КМ-апотрансаминаза + (II); 3 — КМ-апотрансаминаза + (III), 4 — КМ-аспартат-аминотрансфераза + (IV) (в присутствии  $10^{-2}$  М L-аспарагиновой и  $\alpha$ -кетоглутаровой кислот)

Спектры ЭПР фермент-ингибиторных комплексов указывают на незначительную степень иммобилизации спин-метки, что характеризует значительную конформационную подвижность радикала относительно белковой глобулы ( $\tau_c$  всех парамагнитных комплексов не менее  $10^{-9}$  с). Слабая степень иммобилизации всех спин-меток показывает, что возможность конформационной подвижности пиперидинового цикла относительно пиридоксаминового ядра в соединениях (I) и (II) не вносит существенного вклада в иммобилизацию метки, связанной в активном центре. Интересным фактом является незначительная степень иммобилизации соединения (III), практически совпадающая со степенью иммобилизации спин-меток (I) и (II).

Изучение активного центра аспартат-аминотрансферазы показало, что молекула субстрата или ингибитора, связываясь в активном центре, взаимодействует ионизованными анионными группами с двумя катионными центрами, расстояние между которыми составляет  $6,4 \text{ \AA}$  [10]. Можно предполагать, что остатки аспарагиновой в соединении (I) и глутаминовой в соединении (II) кислот в комплексах апотрансаминазы с аналогами (I) и (II) принимают в активном центре конформацию, близкую к конфор-

мации субстратов. При локализации пиридоксаминового цикла и карбоксилатов «субстратной» части аналогов (I) и (II) в активном центре иминоксильная группа спин-меток должна обладать значительной конформационной подвижностью за счет возможности поворотов вокруг пяти связей в отсутствие пространственных препятствий в белке. Связывание соединений (I) и (II) в активном центре сопровождается восстановлением иминоксильной группы, вступающей в реакцию с тиоловой группой активного центра, причем скорость восстановления радикала меньше скорости образования комплекса аналога с апоферментом.

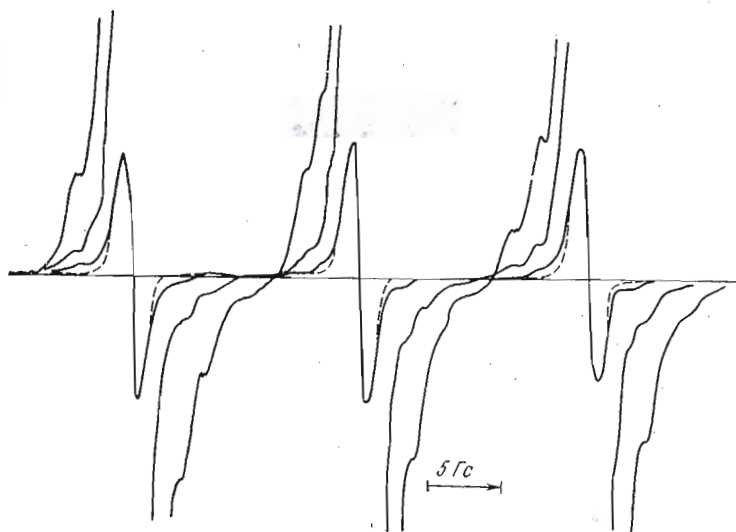


Рис. 9. Спектры ЭПР (I) – (III) в присутствии аспартат-аминотрансферазы при pH 5,2 (запись при разном усилении). Концентрация фермента  $10^{-6}$  М, спин-меченых соединений  $10^{-3}$  М. Спектры фермента со всеми тремя аналогами одинаковы в этих условиях (штриховая линия – радикал в отсутствие белка)

При взаимодействии спин-меченого соединения (III) с апотрансаминазой скорость восстановления радикала значительно выше, чем в случае двух других аналогов, и совпадает со скоростью образования комплекса апотрансаминаза – соединение (III), что характеризует связывание аналога как стадию, определяющую скорости окислительно-восстановительной реакции в активном центре. Это, по нашему мнению, может служить доказательством пространственной сближенности иминоксильного фрагмента (III) и тиоловой группы.

Учитывая структуру и ингибиторные свойства соединения (III), мы предполагаем наиболее вероятным взаимодействие карбоксильной группы соединения (III) с катионным участком в белке, участвующим в связывании  $\alpha$ -карбоксильной группы субстрата. Так как в молекуле соединения (III) расстояние между карбоксильной группой в положении 4 и N $\rightarrow$ O-группой определяется размерами пиридинового цикла, мы имеем возможность оценить расстояние между катионным участком белка, взаимодействующим с карбоксильной группой ингибитора, и тиоловой группой. Рассмотрение молекулярных моделей соединения (III) позволяет принять это расстояние приблизительно равным 5 Å.

Некоторые авторы приводили доказательства локализации одного из остатков цистеина в области активного центра и установили возможность модификации этого остатка при образовании фермент-субстратного соединения [9]. Один остаток цистеина модифицируется также при взаимо-



действии фермента с алкилирующими субстратоподобными агентами [11]. В работе [12] было установлено местоположение этого остатка в полипептидной цепи фермента (Cys-390). По нашему мнению, при действии спин-меченых производных витамина B<sub>6</sub> соединений (I)–(III) модифицируется этот же остаток цистеина.

Связывание соединений (I)–(III) с ферментом и способность конкурировать с субстратом указывает на важную роль карбоксильной группы этих аналогов в образовании комплекса холофермент — аналог. (Использованный нами ранее [2] радикал 2,2,6,6-тетраметил-1-оксипиперидин-4(5'-фосфопиридоксил)-амин, отличающийся от соединения (III) отсутствием карбоксильной группы, не обладал ингибиторными свойствами и не взаимодействовал с холоферментом.)

Спектральные свойства комплексов аспартат-аминотрансферазы со всеми аналогами очень сходны между собой. Наличие в спектре КД этих комплексов характерного отрицательного эффекта Коттона в области поглощения пиридоксаминового цикла аналога указывает на то, что при связывании субстратоподобных фрагментов пиридоксаминового цикла также находится в асимметрическом белковом окружении, однако не препятствует «нормальному» связыванию истинного кофермента.

Спектры ЭПР фермент-ингибиторных комплексов характеризуются незначительным уширением линий. Учитывая «жесткую» структуру аналога (III) и связывание с белком по крайней мере двух фрагментов молекулы (карбоксильная группа и пиридоксаминовый цикл), можно полагать, что слабая степень иммобилизации отражает конформационную свободу того участка в белке, с которым связана спин-метка. Конечно, не исключено, что слабая степень иммобилизации обусловлена изменением конформации активного центра в месте локализации остатка цистеина, модифицированного в результате реакции с радикалом. Однако сравнительно небольшая потеря активности и сохранение способности образовывать фермент-ингибиторный комплекс доказывают, что при такой модификации не затрачиваются каталитически важные группы и группы, участвующие в связывании субстрата.

### Экспериментальная часть

Препарат аспартат-аминотрансферазы сердечной мышцы свиньи получали по методу [13], апофермент аспартат-аминотрансферазы (апоаминазу) — по модифицированному методу Вада и Снелла, как описано в работе [14]. Реактивацию апофермента проверяли по появлению трансаминазной активности и характерного максимума в спектре КД при добавлении ПЛФ. (Реактивация проходила не менее чем на 98%.)

Трансаминазную активность определяли прямым спектрофотометрическим методом по возрастанию оптической плотности при 280 нм, обусловленной образованием енольной формы щавелевоуксусной кислоты в реакции ферментативного переаминирования между L-аспарагиновой и  $\alpha$ -кетоглутаровой кислотами [15]. (Значение  $\epsilon$  щавелевоуксусной кислоты принято равным 600.) Концентрации субстратов и ингибиторов, использованные в кинетических опытах, приведены в подписях к рисункам. Блокирование «внешних» тиоловых групп йодуксусной кислотой проводили в стандартных условиях [16]. Определение числа свободных сульфгидрильных групп проводили по методу Бойера [8] на спектрофотометре «Cary-16» (США), как описано ранее в работе [16]. Спектры поглощения снимали на приборе «Specord UV-Vis» (ГДР), спектры КД на — приборе «Dichrographe II» фирмы «Jouan — Roussel» (Франция), спектры ЭПР — на радиоспектрометре «Varian» E-4 (Швейцария).

Измерение скорости реакции восстановления радикала проводили сравнением интенсивностей сигнала ЭПР образца через разные промежутки времени на приборе ЭПР-II-ИХФ в полиэтиленовых капиллярах.

В работе использовали препараты: моноиодуксусную кислоту, дважды перекристаллизованную из петролейного эфира; N-этилмалеинимид («Lawson», Великобритания); трис-оксиметиламинометан («Reanal», ВНР); ПЛФ («Reanal», ВНР); *n*-хлормеркурибензоат Na («Chemapol», ЧССР); L-аспарагиновую и  $\alpha$ -кетоглутаровую кислоты («Reanal», ВНР),  $\beta$ -эритрокси-D,L-аспарагиновую кислоту, полученную от А. Л. Бочарова, 2,2,6,6-тетраметил-1-оксил-4-оксипиперидин, синтезированный по известному методу [17]. Синтез соединений (I) — (III) описан в статье, которая будет опубликована в журнале «Известия АН СССР. Серия химическая».

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Лихтенштейн Г. И. (1974) Метод спиновых меток в молекулярной биологии, «Наука».
2. Misharin A. Yu., Polyansky O. L., Timofeev V. P. (1974) FEBS Letters, 41, 131–134.
3. Braunstein A. E. (1973) The Enzymes, 9, 3rd. ed. Part B, 379–481.
4. Ivanov V. I., Karpeisky M. Ya. (1969). Advances Enzymol. and related subject biochem. (1969), 32, 21–49.
5. Jenkins W. T. (1961) J. Biol. Chem., 236, 1121–1125.
6. Jenkins W. T. (1964) J. Biol. Chem., 239, 1742–1747.
7. Диксон М., Уэбб Э. (1966) Ферменты, стр. 54–147, «Мир».
8. Boyer P. D. (1954). J. Amer. Chem. Soc., 76, 4331–4337.
9. Birchmeier W., Christen P. (1971) FEBS Letters, 18, 209–213.
10. Северин Е. С., Ковалева Г. К., Сащенко Л. П. (1972) Биохимия, 37, 469–474.
11. Morino V., Okamoto M. (1973) J. Biol. Chem., 248, 82–90.
12. Birchmeier W., Wilson K. J., Christen P. (1973) J. Biol. Chem., 248, 1751–1759.
13. Поляновский О. Л., Телегди М. (1965) Биохимия, 30, 174–181.
14. Бочаров А. Л., Демидкина Т. В., Поляновский О. Л., Карпейский М. Я. (1973) Молекулярн. биология, 7, 620–631.
15. Jenkins W. T., Sizer J. W. (1959) J. Biol. Chem., 234, 51–57.
16. Polyansky O. L., Nosikov V. V., Deyev S. M., Braunstein A. E., Grishin E. V., Ovchinnikov Yu. A. (1973) FEBS Letters, 35, 322–326.
17. Розанцев Э. Г. (1970) Стабильные нминоксильные радикалы, «Химия».

Поступила в редакцию  
3.IX.1974

#### INTERACTION OF THE SPIN-LABELED INHIBITORS WITH ASPARTATE AMINOTRANSFERASE

MISHARIN A. Yu., AZHAYEV A. V., TIMOFEEV V. P., POLYANOVSKY O. L.

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

The active site of pyridoxal phosphate dependent enzyme, L-aspartate-2-oxoglutarate aminotransferase (E.C.2.6.1.1.), was studied with the aid spin-labeled derivatives of vitamin B<sub>6</sub>. These analogs were shown to have a high affinity for the apoenzyme, as well as for holoenzyme and to be effective competitive inhibitors of holoenzyme. ESR spectra of the complexes of holoenzyme with spin-labeled inhibitors indicate a slight immobilisation of spin-labels. Spectral and inhibitor characteristics of the aspartate aminotransferase complexes with analogs indicate the essential role of the substrate-like part of the analogs in binding with the protein. On interaction of equimolar quantities of spin-labeled derivatives and apoenzyme, the ESR-signal disappears due to the reduction of iminoxyl group by the thiol group of cysteine residue. This redox reaction takes place only in the case when the molecule of analog is specifically bound to the enzyme, which allowed to evaluate the distance between the thiol group and cationic site responsible for binding of substrate carboxyl function.