



УДК 577.152.111*1'134

СЕЛЕКТИВНЫЙ МЕТОД ТИТРОВАНИЯ АКТИВНЫХ ЦЕНТРОВ
АЛКОГОЛЬДЕГИДРОГЕНАЗЫ ХЛОР- И
ГИДРОКСИМЕРКУРИБЕНЗОАТОМ*Рогожин В. В., Говорова Т. П., Кершенгольц Б. М.**Институт биологии Якутского филиала Сибирского отделения
Академии наук СССР, Якутск*

На примере алкогольдегидрогеназы зерен пшеницы показана перспективность использования хлор- и гидроксимеркурибензоата (СМВ и НМВ) для титрования активных центров фермента. Низкие константы ингибирования (0,008–0,1 мкМ) позволяют проводить титрование фермента в грубых экстрактах тканей с определением числа активных центров. Показано, что в области активного центра алкогольдегидрогеназы располагаются две SH-группы с pK 7,4 и 8,2. Исследован процесс ингибирования фермента под действием СМВ и НМВ. Показано, что ингибиторы, связываясь в области активного центра фермента, конкурируют с окисленной и восстановленной формами NAD. При этом наблюдается смешанный тип ингибирования, а по отношению к субстратам (этанолу и ацетальдегиду) – неконкурентный. Высказаны предположения о роли SH-групп алкогольдегидрогеназы в катализе.

Соединения, содержащие ртуть в низких концентрациях, избирательно реагируют с SH-группами белков [1], и это позволяет использовать для количественного определения SH-групп в белках или ферментах монофункциональные органические соединения ртути типа R-Hg-X (*n*-хлормеркурибензоат, *n*-хлормеркурифенилсульфат, гидроксимеркурибензоат и др.) [2]. В данной работе для титрования активных центров алкогольдегидрогеназы предложено использовать два ртутьсодержащих соединения – хлор- и гидроксимеркурибензоат.

В литературе имеется мало работ по изучению алкогольдегидрогеназы растений [3], хотя этот фермент выполняет одну из важнейших функций по метаболизму эндогенных спиртов и альдегидов в клетках в присутствии окисленных и восстановленных форм NAD. Однако обширно представлены данные по исследованию строения активных центров алкогольдегидрогеназы дрожжей, печени лошади и человека [4–9]. Алкогольдегидрогеназа дрожжей состоит из четырех субъединиц, а фермент печени человека – из двух [10]. В активном центре алкогольдегидрогеназы печени человека располагаются шесть SH-групп. Две из них образуют связь с ионом Zn^{2+} , принимающим участие в каталитическом акте [11]. Методом рентгеноструктурного анализа изучено строение алкогольдегидрогеназы печени лошади [12]. Показано, что в связывании каталитического атома Zn^{2+} принимают участие атомы серы остатков Cys-46 и -174. При модификации алкогольдегидрогеназы дрожжей и печени лошади аналогами NAD с последующей идентификацией меченых остатков установлено, что в связывании аналогов в активном центре фермента участвует Cys-43 фермента дрожжей и Cys-174 фермента печени [13]. Обработка дрожжевой алкогольдегидрогеназы *n*-хлормеркурибензоатом приводила к необратимой модификации функционально важной SH-группы, сопровождающейся снижением активности фермента [14].

Ранее был предложен метод титрования активных центров алкогольдегидрогеназы печени лошади NAD и NADH в присутствии пиразола или изобутирамида [15]. Однако этот метод оказался мало чувствительным

Принятые сокращения: СМВ – хлормеркурибензоат, НМВ – гидроксимеркурибензоат.

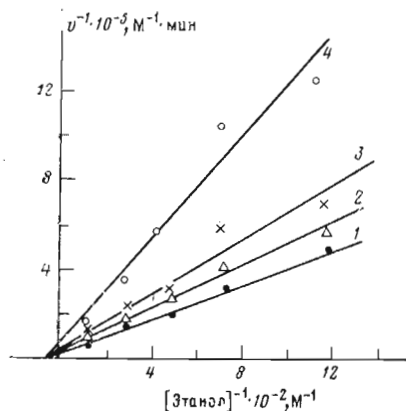


Рис. 1

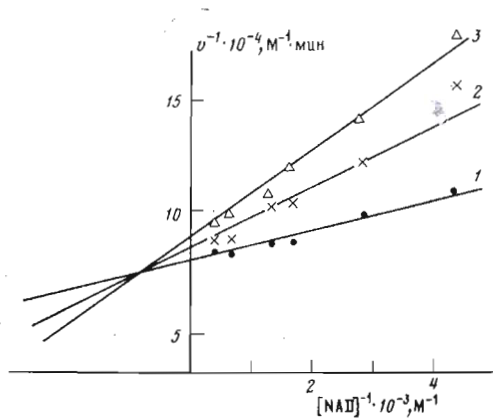


Рис. 2

Рис. 1. Зависимость начальной скорости окисления этанола в присутствии алкогольдегидрогеназы пшеницы от его концентрации в координатах Лайнуивера – Берка при концентрации НМВ: 0 (1), 2,2 (2), 4,4 (3), 8,8 мкМ (4). Условия: 23° С, 0,1 М буфер глицин – NaOH, pH 10, [NAD] 36 мМ; [E] 0,44 мкМ

Рис. 2. Зависимость начальной скорости окисления этанола от концентрации NAD в координатах Лайнуивера – Берка при концентрации НМВ: 0,28 (1), 0,56 (2), 1,1 мкМ (3). Условия: см. подпись к рис. 1; [этанол] 16,4 мМ; [E] 0,44 мкМ

и требующим больших концентраций фермента (2–6 мкМ); при этом можно проводить титрование только очищенных образцов фермента.

Целью настоящей работы было изучение механизма ингибирования алкогольдегидрогеназы растительного происхождения ртутьсодержащими соединениями, разработка высокочувствительного и селективного метода спектрофотометрического титрования активных центров фермента, а также исследование функциональной роли SH-групп в каталитической активности фермента.

Алкогольдегидрогеназа (КФ 1.1.1.1) катализирует процесс окисления этанола в присутствии NAD. Реакция легко обратима в физиологической области pH.

Изучена кинетика ингибирования хлор- и гидроксимеркурибензоатом алкогольдегидрогеназы зерна пшеницы «Якутянка» (далее алкогольдегидрогеназа) в прямой и обратной реакции по отношению к субстратам (этанолу и ацетальдегиду) и кофакторам (NAD и NADH). Кинетика окисления этанола и восстановления ацетальдегида алкогольдегидрогеназой как в присутствии, так и в отсутствие НМВ подчиняется уравнению Михаэлиса – Ментен. Влияние НМВ на начальную скорость окисления этанола показано на рис. 1. Точка пересечения прямых 1–4 лежит на оси абсцисс, что свидетельствует о некооперативном типе ингибирования. Аналогичный тип ингибирования наблюдается и в реакции восстановления ацетальдегида (таблица). Изучена конкуренция ртутьпроизводных с коферментами NAD или NADH (рис. 2). Константы ингибирования находили методом Диксона, который позволяет определять K_i непосредственно из кинетических данных, не прибегая к дополнительным построениям (рис. 3). Полученные значения констант ингибирования алкогольдегидрогеназы в прямой и обратной реакции при оптимальных значениях pH 10,0 и 6,5 различаются в 470 раз, данные по конкуренции с NAD и NADH – в 38 раз (таблица). Константы Михаэлиса для субстратов (этанола и ацетальдегида) и кофакторов (NAD и NADH) в $5 \cdot 10^2$ – $9 \cdot 10^4$ раз выше, чем константы связывания НМВ. Ингибиторы, взаимодействуя с SH-группами, конкурируют с коферментами за коферментсвязывающий участок активного центра, а также влияют собственно на каталитический процесс. Участок связывания субстратов (этанола, ацетальдегида) в активном центре алкогольдегидрогеназы пространственно отделен от каталитического участка [10], поэтому, возможно, НМВ

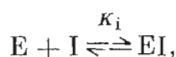
Субстраты, коферменты	pH	Ингибиторы	Тип ингибирования	K_i , мкМ	$F_{\text{ин}}$, мМ
Этанол	10,0	HMB	Неконкурентный	4,7	12,0
Ацетальдегид	6,5	»	»	0,01	0,91
NADH	6,5	»	Смешанный	0,01	0,25
NAD	10,0	»	»	0,38	0,2
»	10,0	СМВ	»	0,45	0,2

и СМВ влияют только на каталитический процесс превращения субстратов.

Высокое сродство ртути содержащих ингибиторов к SH-группам активного центра фермента позволило нам разработать метод титрования активных центров алкогольдегидрогеназы хлор- и гидроксимеркурибензоатом.

Ингибиторы практически необратимо связываются в области активного центра фермента, что было показано с помощью разбавления и разделения смеси фермент — ингибитор на сефадексе G-25. Активность фермента после инкубации с 4-кратным избытком ингибитора в течение 10 мин и хроматографии на G-25 не восстанавливается. Добавление в инкубационную среду этанола или NAD не оказывало влияния на скорость связывания HMB и СМВ с алкогольдегидрогеназой.

Титрование алкогольдегидрогеназы проводили в широком диапазоне pH: от 6 до 11. Для определения константы ингибирования было предложено использовать схему



где E — фермент, I — ингибитор, EI — фермент-ингибиторный комплекс. При условии $[E]_0 \approx [I]_0$ с учетом баланса по ферменту $[E]_0 = [E] + [EI]$ и ингибитору $[I]_0 = [I] + [EI]$ определение K_i проводили по уравнению (1):

$$\frac{1}{1 - \alpha} = \frac{1[I]_0}{K_i \alpha} - \frac{[E]_0}{K_i} \quad (1)$$

где $\alpha = \frac{[EI]}{[E]} = \frac{v_0 - v_i}{v_0}$ — доля фермента, связанного с ингибитором (v_0 и v_i — скорости ферментативных реакций в отсутствие и в присутствии ингибитора).

Из графика, построенного в координатах $\left(\frac{1}{1 - \alpha}; \frac{[I]_0}{\alpha}\right)$, мы непосредственно определили концентрацию фермента ($[E]_0$) из отрезка, отсекаемого на оси абсцисс. Тангенс угла наклона прямой равен $1/K_i$ (рис. 4). Расчет концентрации алкогольдегидрогеназы проводили с учетом существования фермента в димерной форме (на титрование одной молекулы фермента идет две молекулы ингибитора).

При $[I]_0 \gg [E]_0$ для определения константы ингибирования использовали уравнение Скэтчарда [16]:

$$\alpha = n - K_i \frac{\alpha}{[I]_0} \quad (2)$$

Из рис. 5 видно, что при спрямлении данных в координатах Скэтчарда K_i определяется из тангенса угла наклона.

Изучение pH-зависимости константы ингибирования алкогольдегидрогеназы гидроксимеркурибензоатом позволило определить значения рК функционально важных SH-групп, расположенных в области активного центра фермента и участвующих в катализе. Число SH-групп, согласно тангенсу угла наклона, близко к двум (рис. 6). Причем, как в реакции окисления этанола, так и при восстановлении ацетальдегида принимают участие две SH-группы с рК 8,2 и 7,4. Следовательно, можно предполо-

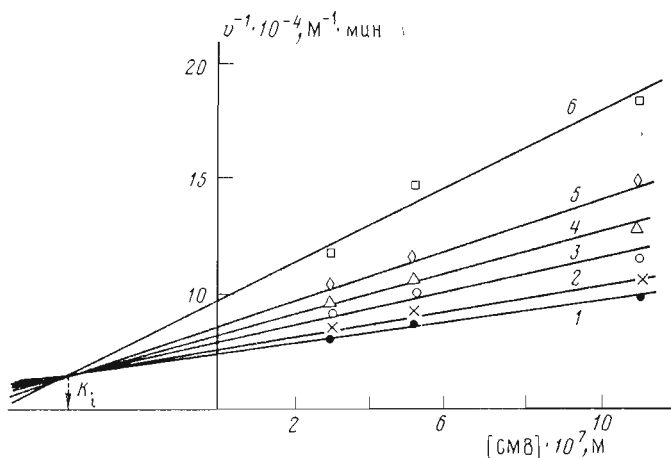


Рис. 3. Зависимость начальной скорости окисления этанола от концентрации СМВ в координатах Диксона при концентрации NAD: 2,88 (1), 1,44 (2), 0,72 (3), 0,58 (4), 0,34 (5), 0,23 мМ (6). Условия см. подпись к рис. 2

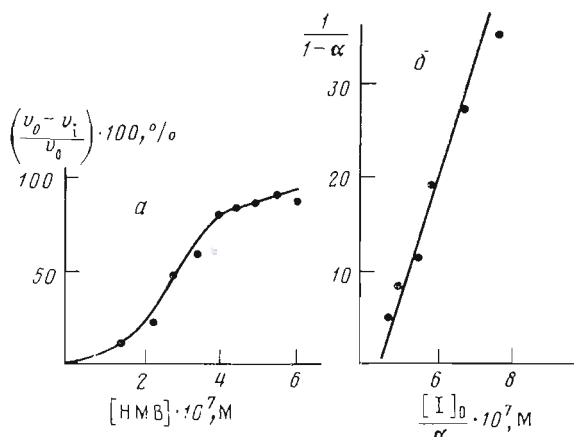
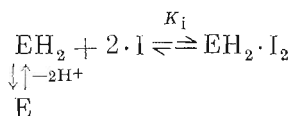


Рис. 4. Титрование активных центров алкогольдегидрогеназы пшеницы. *a* – ингибирование фермента действием НМВ; *b* – определение концентрации алкогольдегидрогеназы и K_i . Условия: 23° С, 0,1 М Na-фосфатный буфер, рН 6,5; $[E]_0$ 0,23 мкМ; $[NADH]$ 0,45 мМ; $[ацетальдегид]$ 4 мМ

жить, что алкогольдегидрогеназа присутствует в двух формах (EH_2 и E):



Удаление двух протонов переводит фермент в форму с пониженной реакционной способностью SH-групп по отношению к НМВ. Это, по-видимому, обусловлено тем, что SH-группы становятся менее доступными ингибитору. Пониженное значение pK SH-групп, участвующих в процессе восстановления ацетальдегида, свидетельствует о появлении вблизи каталитического участка основных групп, принимающих участие в катализе.

Нами изучено средство SH-групп активного центра алкогольдегидрогеназы к НМВ титрованием SH-групп нативного фермента и денатурированного путем инкубации его при 60° С в течение 20 мин. Активность фермента в денатурированном состоянии составляла 43% от исходной. Показано, что на титрование SH-групп как нативного, так и денатуриро-

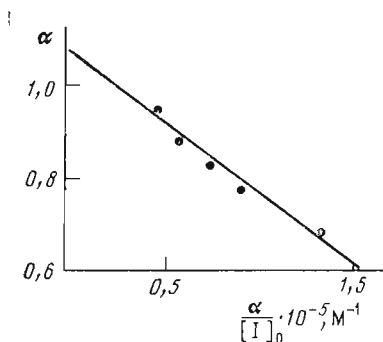


Рис. 5

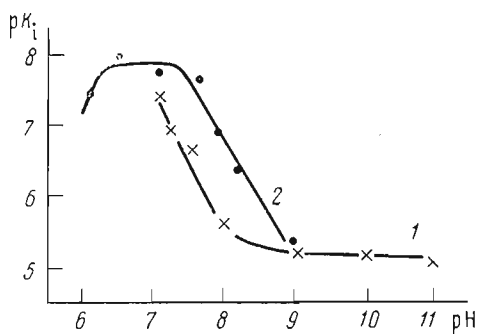


Рис. 6

Рис. 5. График Скэтчарда для ингибирования алкогольдегидрогеназы действием НМВ при соотношении $[E]_0 \ll [I]_0$ в реакции восстановления ацетальдегида. Условия: 23°C , 0,1 М буфер глицин – NaOH, pH 9; [НМВ] 5,5–27,6 мкМ, [NADH] 0,45 мМ; [ацетальдегид] 4 мМ; [E] 0,2 мкМ

Рис. 6. pH-зависимости константы ингибирования гидроксимеркурибензоатом окисления этанола (1) и восстановления ацетальдегида (2), катализируемых алкогольдегидрогеназой пшеницы. Условия: 23°C , 0,1 М Na-фосфатный буфер (pH 6,0–8,2), 0,1 М буфер глицин – NaOH (pH 9–11). [Этанол] 16,4 мМ; [НМВ] 0,055–8,8 мкМ; [NAD] 1,44 мМ; [ацетальдегид] 4 мМ; [NADH] 0,45 мМ

ванного фермента идет одинаковое количество ингибитора. Можно предположить поэтому, что реакционная способность SH-групп к взаимодействию с НМВ одинакова для нативной и денатурированной форм алкогольдегидрогеназы, т. е. метод позволяет определять все активные центры фермента как в нативном, так и в денатурированном состоянии.

Следует отметить преимущества НМВ и СМВ в титровании активных центров алкогольдегидрогеназы.

1. НМВ и СМВ обладают большей реакционной способностью по отношению к SH-группам активного центра алкогольдегидрогеназы, чем использованный ранее пиразол [15]. Чувствительность данного метода в 20–30 раз выше по сравнению с пиразольным. Низкие значения констант связывания НМВ и СМВ с SH-группами (8–100 нМ) позволяют титровать фермент в грубом экстракте.

2. Метод приемлем и для титрования активных центров алкогольдегидрогеназы животных тканей. Однако в гомогенатах тканей печени находится значительное количество низкомолекулярных гемсодержащих соединений с высоким сродством к НМВ и СМВ, что затрудняет проведение титрования. Титровать алкогольдегидрогеназу животных тканей возможно только после предварительной частичной очистки фермента. Так, после пропускания гомогената печени человека через колонку с сефадексом G-100 происходит отделение низкомолекулярных гемсодержащих соединений. После этого можно проводить титрование алкогольдегидрогеназы. Подобной очистке была подвергнута и алкогольдегидрогеназа печени суслика.

Результаты титрования алкогольдегидрогеназы гидрокси- и хлормеркурибензоатом хорошо согласуются с данными, полученными пиразольным методом.

Экспериментальная часть

Использовали алкогольдегидрогеназу, выделенную из зерен пшеницы сорта «Якутянка» по следующей методике. Зерна гомогенизировали на механическом гомогенизаторе до получения однородной массы. Добавляли 0,05 М раствор глицина в соотношении 1 : 3 (на 1 г семян 3 мл раствора). После перемешивания клетки дополнительно разрушали действием ультразвука на диспергаторе (22 кГц, 60 с, 0°C). Для удаления не полностью разрушенных клеток и ядер гомогенат зерен центрифугировали 10 мин при 7000 g. В супернатант добавляли этанол до 20% концентрации, интенсивно встряхивали в течение 5 мин, смесь центрифугировали. Супернатант пропускали через колонку (1×30 см) с сефадексом G-25, уравновешенным 0,05 М раствором глицина. Элюирование проводили этим же раствором. Фракции с наибольшей активностью и малым фоном лиофилизировали. Образец содержал 60–70%

алкогольдегидрогеназы от общего содержания белков. Белок определяли по методу Лоури [16].

Очистку алкогольдегидрогеназы печени человека проводили по разработанной нами методике. Предварительно многократно промытую печень гомогенизировали на механическом гомогенизаторе. Неразрушенные клетки осаждали центрифугированием, к надосадочной жидкости прибавляли охлажденный (0°С) этанол до 20% концентрации. После перемешивания и встряхивания центрифугировали при 7000 g. Супернатант пропустили через колонку (2,5×50 см) с сефадексом G-100, уравновешенным 0,05 M раствором глицина. В отобранных фракциях определяли активность фермента по методу [5] (см. ниже). Для исследования отбирали фракции с максимальным содержанием алкогольдегидрогеназы и с наименьшим содержанием гемоглобина.

n-Гидроксимеркурибензоат-Na (Serva, ФРГ), окисленный и восстановленный никотинамидадениндинуклеотид (NAD и NADH; Reanal, Венгрия) использовали без дополнительной очистки; этанол очищали перегонкой. Остальные реактивы соответствовали квалификации ос. ч. Для приготовления растворов использовали бидистиллированную воду.

Концентрацию алкогольдегидрогеназы определяли спектрофотометрически по спектру поглощения комплекса фермента с NAD в присутствии пиразола [15].

Спектральные измерения выполняли на двухлучевом спектрофотометре Specord UV-VIS (ГДР).

Активность алкогольдегидрогеназы определяли при 23°С в прямой реакции по скорости окисления этанола и образования NADH при длине волны 340 нм ($\epsilon_{340} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). К 2,2 мл 0,1 M глицин-NaOH-буфера, pH 10, добавляли 0,1 мл 36 mM NAD и 0,1 мл 2,5 мкM раствора фермента. Реакцию инициировали введением 0,1 мл 0,41 M этанола. Обратную реакцию рассчитывали по скорости восстановления ацетальдегида, регистрируя спектрофотометрически уменьшение NADH.

К 2,2 мл 0,1 M Na-фосфатного буфера, pH 6,5, добавляли 0,1 мл 11,3 mM NADH и 0,1 мл 2,5 мкM раствора фермента. Реакцию инициировали 0,1 мл 0,1 M раствора ацетальдегида. За меру активности фермента принимали количество микромолей NADH, восстановленного или окисленного за 1 мин.

Ингибирование фермента гидрокси- и хлормеркурибензоатом изучали при pH 6,5 и 10 путем добавления в кювету вместе с субстратами ингибиторов при насыщающей концентрации одного из субстратов.

Титрование активных центров алкогольдегидрогеназы проводили путем добавления НМВ и СМВ в кювету, содержащую насыщающие концентрации субстратов. Активность фермента регистрировали как описано выше.

ЛИТЕРАТУРА

1. Виноградова Р. П. Молекулярные основы действия ферментов. М.: Высш. школа, 1978. С. 148—162.
2. Торчинский Ю. М. Сера в белках. М.: Наука, 1977. С. 168—203.
3. Stilorova M., Zeblova S. // Collect. Czech. Chem. Commun. 1978. V. 43. № 10. P. 253—259.
4. Рабинович С. Э., Дорошко А. И. // Биохимия. 1985. Т. 50. № 3. С. 384—393.
5. Кершенгольц Б. М., Рогожин В. В. // Биохимия. 1979. Т. 44. № 4. С. 661—671.
6. Holmes R. S., Duley Y. A., Alger E. M., Mather P. B., Rout U. K. // Alcohol and Alcoholism. 1986. V. 21. № 1. P. 41—56.
7. Wagner F. W., Pares X., Holmquest B., Vallee B. L. // Biochemistry. 1984. V. 23. № 5. P. 2193—2199.
8. Klinman Y. P., Welsh K. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1976. V. 70. № 3. P. 878—884.
9. Czertlinski J. H., Wagner M., Frichson I. O., Theorell H. // Acta chem. scand. 1975. V. 29. S. 797—810.
10. Клесов А. А., Березин Н. В. Ферментативный катализ. М.: Изд-во МГУ, 1980. С. 82—106.
11. Dickenson Ch. I., Dickenson F. M. // Biochem. J. 1976. V. 153. № 2. P. 309—319.
12. Eklund H., Nordstrom B., Zeppezauer E., Soderlund G., Ohlsson I., Boiwe T., Rhanden C.-I. // FEBS Lett. 1974. V. 44. № 2. P. 200—204.
13. Cornvall H., Woenchaus C., Schattle E., Geck R. // FEBS Lett. 1975. V. 54. № 2. P. 297—301.
14. Barron E. S. G., Levine S. // Arch. Biochem. and Biophys. 1952. V. 41. № 1. P. 175—180.
15. Einarsson R., Widell L., Zeppezauer M. // Analyt. Letters. 1976. V. 9. № 9. P. 815—823.
16. Фершт Э. Структура и механизм действия ферментов. М.: Мир, 1980. С. 208—209.

Поступила в редакцию

24.II.1988

После доработки

4.V.1988

SELECTIVE METHOD OF TITRATION OF ALCOHOLDEHYDROGENASE
ACTIVE CENTRES WITH CHLORO- AND HYDROXYMERCURIBENZOATE

ROGOZHIN V. V., GOVOROVA T. P., KERSHENGOLTS B. M.

*Institute of Biology, Yakut Branch, Siberian Division, Academy of Sciences of the
USSR, Yakutsk*

Usefulness of chloro- and hydroxymercuribenzoate (CMB and HMB) for titration of active centres of enzymes exemplified by alcoholdehydrogenase from wheat seeds is shown. Low constants of inhibition (0,008—0,01 mM) allow titration of the enzyme in tissue crude extracts with determination of the number of active centres. It is shown that there are two SH-groups with pK 7,4 and 8,2 located in the area of the alcoholdehydrogenase active centre. The process of inhibition of the enzyme by CMB and HMB is investigated. Inhibitors, binding in the area of the enzyme active centre, compete with oxidized and reduced forms of NAD (a mixed type of inhibition is observed); inhibition is noncompetitive towards substrates (ethanol and acetaldehyde). The role of SH-groups of alcoholdehydrogenase in the catalysis is discussed.