



УДК 577.152.276 * 2.042 : 535.370

© 1993 С. А. Маскевич, А. А. Маскевич,
Л. Н. Кивач, И. П. Черникевич *, С. В. Забродская *,
Д. А. Опарин *

СПЕКТРОСКОПИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ СТРУКТУРЫ И ВНУТРИМОЛЕКУЛЯРНОЙ ПОДВИЖНОСТИ ДРОЖЖЕВОЙ ПИРУВАТДЕКАРБОКСИЛАЗЫ

Гродненский государственный университет им. Я. Купалы, Гродно;

* Институт биохимии АН Беларуси, Гродно

С использованием стационарной и разрешенной во времени флуориметрии изучены свойства холо- и апопируватдекарбоксилазы из пивных дрожжей при взаимодействии с субстратом (пируват), кофактором (тиаминдифосфат) и ионом Mg^{2+} . Анализ собственной флуоресценции фермента, а также комплекса его с зондом (TNS) показывает, что тиаминдифосфат связывается в полярной области активного центра, вызывая уменьшение подвижности ближайшего белкового окружения. Флуоресцентный зонд имеет три различных участка связывания с апофермой белка, два из которых локализованы в области каталитического центра и обладают различной свободой вращения.

Исследование комплекса пируватдекарбоксилазы с тиохромпирофосфатом, структурным аналогом тиаминдифосфата, свидетельствует, что помимо полярного имеется неполярный участок активного центра фермента для сорбции пирувата. Присоединение пирувата к нему происходит независимо от связывания кофактора. На основании данных флуоресцентных исследований предложена схема расположения тиаминдифосфата и пирувата в каталитическом центре пируватдекарбоксилазы.

Пируватдекарбоксилаза (карбокси-лиаза 2-оксокислот, КФ 4.1.1.1) из микроорганизмов, в частности из дрожжей, катализирует реакцию простого декарбоксилирования пировиноградной кислоты с образованием уксусного альдегида и CO_2 [1]. В настоящее время существует ряд моделей организации активного центра фермента и последовательности протекания отдельных стадий ферментативного процесса [2—4]. Наиболее общепринятым считается мнение, что тиаминдифосфат и пируват при участии ионов металлов связываются в активном центре фермента, который, как показано на основании флуоресцентных исследований [4, 5], представляет собой гидрофобную полость. Происходящие затем локальные конформационные изменения белка способствуют сближению α -кар-

Принятые сокращения: ThDP — тиаминдифосфат, ThrDP — тиохромдифосфат, TNS — 2-толуидинил-6-нафталинсульфонат, Puv — пируват, PDC — пируватдекарбоксилаза, aPDC и hPDC — апо- и холоформы пируватдекарбоксилазы.

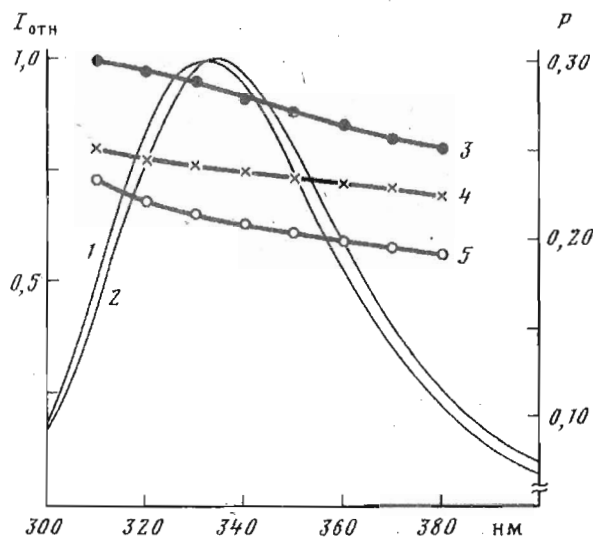


Рис. 1. Спектры флуоресценции аРДС (1) и hРДС (2) и зависимости степени поляризации от длины волны для hРДС (3, 4) и аРДС (5) при $\lambda_{\text{возб}}$ 295 (4, 5) и 305 нм (3). Условия определения см. в подписи к табл. 1

бонильной группы пирувата с атомом углерода во втором положении тиаминдифосфата [6], ведущему в дальнейшем к образованию ковалентной связи между поляризованным карбонильным углеродом субстрата и имеющим имидный характер С-2-атомом тиазолового цикла тиаминдифосфата. Последующее перераспределение электронной плотности в пирувате приводит к декарбоксилированию с выделением CO_2 [1]. Связывание тиаминдифосфата с белком осуществляется посредством пирофосфатной группы и атома азота в положении «1» пиримидинового цикла. Пируват сорбируется благодаря гидрофобным взаимодействиям [4].

Скорость пируватдекарбоксилазной реакции лимитируется способностью реагентов к диффузии и подвижностью аминокислотных остатков, входящих в активный центр фермента. Однако динамика белковой макромолекулы, влияние на нее субстратов, эффекторов и кофакторов до настоящего времени практически не изучены. Рассмотрению этих вопросов посвящена настоящая работа.

Спектрально-кинетические исследования собственной флуоресценции пируватдекарбоксилазы

На рис. 1 приведены спектры триптофановой флуоресценции и спектральные зависимости степени поляризации флуоресценции пируватдекарбоксилазы в апо- и холоформе (аРДС и hРДС). Коротковолновое положение максимумов спектров излучения для этих форм (331—332 нм) указывает на то, что излучающие остатки триптофана локализованы в относительно гидрофобном, мало доступном водной среде окружения. В холоформе белок содержит кофермент тиаминдифосфат. Видно, что максимум спектра излучения hРДС имеет более коротковолновое положение и более высокие значения степени поляризации флуоресценции. При этом заметных различий в интенсивности флуоресценции растворов для этих форм белка не наблюдается. Данные результаты показывают, что связывание тиаминдифосфата с аРДС приводит к конформационным изменениям в белковой молекуле, в результате которых уменьшается полярность микроокружения триптофановых остатков, а также их подвижность.

Кривая затухания флуоресценции обеих форм фермента является неэкспоненциальной и может быть представлена суммой трех экспонент (табл. 1).

Параметры собственной флуоресценции hPDC и aPDC при $\lambda_{\text{возб}} 296$ (первая строка) и 305 нм (вторая строка), $\lambda_{\text{фл}} 330$ нм

Условия определения: калий-фосфатный буфер (pH 7,1), $T 293$ К, $[E] 1,5 \cdot 10^{-6}$ М

Форма фермента	$\lambda_{\text{макс}}, \text{нм}$	P	$\tau_1/\tau_2/\tau_3^*, \text{нс}$	$A_1/A_2/A_3^*$
hPDC	331,0	0,23	5,02/3,08/0,45	0,56/0,16/0,28
	331,5	0,25		
aPDC	332,5	0,22	5,44/3,01/0,99	0,36/0,33/0,31
	336,0	0,24		

* См. «Экспериментальную часть».

Сравнивая приведенные в таблице параметры A и τ , можно видеть, что связывание кофермента приводит главным образом к уменьшению длительности компонента с τ_3 . При этом амплитуда первого компонента увеличивается, а второго уменьшается (\sim в 2 раза).

Поскольку пируватдекарбоксилаза содержит в своем составе большое число триптофановых остатков, возникает вопрос об идентичности их микроокружения. Гетерогенность триптофановых остатков может проявляться в их излучательных характеристиках, в частности она обнаруживается по наличию bathochromной флуоресценции при краевом возбуждении. Это имеет место для апоформы белка, где при краевом возбуждении (305 нм) длинноволновый сдвиг максимума спектра излучения составляет $\sim 3,5$ нм (табл. 1). Помимо отмеченной гетерогенности причиной наблюдаемого эффекта может быть диполь-дипольная релаксация, происходящая параллельно с излучением, а также триптофан-триптофановый перенос энергии электронного возбуждения. Все эти процессы, по-видимому, являются причиной спектральной зависимости длительности и степени поляризации флуоресценции, т. е. излучающие остатки триптофана имеют наносекундную внутримолекулярную подвижность и способны за времена, сопоставимые с длительностью свечения, поворачиваться в процессе релаксации на определенный угол. Увеличение длительности на длинноволновом краю спектра отражает тот факт, что более длинноволновые хромофоры обладают большей длительностью свечения.

Для hPDC bathochromный сдвиг спектра флуоресценции весьма незначителен (менее 1 нм). Поскольку зависимость спектров флуоресценции от $\lambda_{\text{возб}}$ является прежде всего следствием гетерогенности хромофоров в основном состоянии, приводящей к различию их спектров поглощения, исчезновение такой зависимости, по всей видимости, обусловлено уменьшением гетерогенности для холоформы PDC. Уменьшение зависимости степени поляризации по спектру флуоресценции hPDC, отмеченное на рис. 1 (кривые 3, 4), также подтверждает это предположение. Таким образом, присоединение кофактора приводит к увеличению жесткости структуры белка и уменьшению подвижности триптофанилов, локализованных прежде всего вблизи активного центра. Полученные данные хорошо согласуются с представлениями о роли триптофановых остатков в связывании кофактора, известной из результатов химической модификации фермента и факта консервативности этих остатков для трех изоформ фермента [7, 8].

Поскольку в спектрах поглощения апо- и холоформы фермента заметных различий не наблюдается, очевидно, комплекс с переносом заряда между остатками триптофана и тиаминдифосфатом отсутствует, несмотря на значительное влияние кофермента на полярность и динамику определенной части остатков

Параметры флуоресценции комплексов hPDC и aPDC с TNS, пируватом, Mg^{2+} и тиаминдифосфатом при $\lambda_{\text{фл}} 330 \text{ нм}$, $[TNS] 2 \cdot 10^{-5} \text{ М}$, $[Pyr] 2,5 \cdot 10^{-3} \text{ М}$, $[Mg^{2+}] 5 \cdot 10^{-3} \text{ М}$, $[ThDP] 1,5 \cdot 10^{-5} \text{ М}$

Условия определения см. в подписи к табл. 1

Комплекс	$\lambda_{\text{возб}}, \text{ нм}$	$\lambda_{\text{фл}}^{\text{макс}}, \text{ нм}$	P	τ_1/τ_2^* , нс	A_1/A_2^*
hPDC—TNS	350	427,8	0,32/0,30**	12,4/5,2	0,45/0,55
	390	432,6			
aPDC—TNS	350	434,2	0,33	11,3/4,0	0,73/0,27
aPDC— Mg^{2+} —TNS	350	433,8	0,33	10,9/4,3	0,69/0,31
	390	436,1			
aPDC— Mg^{2+} —Pyr—TNS	350	434,7	0,35	10,0/3,7	0,71/0,29
	390	435,8			
aPDC— Mg^{2+} —ThDP—TNS	350	428,0	0,32		

* См. «Экспериментальную часть».

** $[TNS] 6 \cdot 10^{-5} \text{ М}$.

триптофана. Наиболее вероятной тому причиной является не их пространственная удаленность, а отсутствие необходимой ориентации.

Следует отметить, что проведенное исследование не позволяет оценить влияние отдельных факторов (релаксация, гемоперенос энергии, гетерогенность) на спектр и кинетику собственной флуоресценции пируватдекарбоксилазы. В связи с этим представляется важным исследование белка с использованием флуоресцентных зондов, в частности TNS, образующего комплекс в области активного центра.

Исследование микроокружения активного центра пируватдекарбоксилазы с помощью флуоресцентного зонда TNS

Флуоресцентный зонд TNS эффективно связывается в активном центре фермента, а именно: в случае hPDC центром сорбции зонда является гидрофобный участок, ответственный за связывание с пируватом [4].

Флуоресцентные характеристики комплекса TNS—hPDC приведены в табл. 2. Коротковолновое положение спектра флуоресценции, а также высокие значения степени поляризации свидетельствуют, что молекулы зонда достаточно жестко фиксируются на белке. Затухание флуоресценции TNS является неэкспоненциальным и может быть с удовлетворительным качеством аппроксимации представлено суммой двух экспонент.

Математический анализ кривой зависимости интенсивности флуоресценции комплекса от концентрации TNS показал, что имеется два типа излучающих центров комплекса TNS—hPDC с константами связывания, равными соответственно $1 \cdot 10^{-3}$ и $2 \cdot 10^{-4} \text{ М}^{-1}$. Это может быть в случае, если на белке существуют два различных центра связывания с зондом или если сорбированный на белке зонд находится в двух конформационных состояниях.

Существенно то, что при увеличении концентрации TNS, т. е. увеличении концентрации комплекса зонд—белок, степень поляризации флуоресценции уменьшается (табл. 2). Данное обстоятельство указывает на то, что излучающие центры с меньшей константой связывания имеют несколько большую подвижность. Результаты, аналогичные описанным выше для hPDC, получаются, если холоформу фермента получать не из исходного материала, а из апоформы путем инкубации с ионами Mg^{2+} и тиаминдифосфатом.

Интенсивность флуоресценции TNS, связанного с aPDC, значительно выше,

Параметры флуоресценции тиохромдифосфата и комплекса ThrDP— α PDC в растворах и константы штерн-вольмеровского тушения флуоресценции пирувата при $\lambda_{\text{возб}}$ 350 нм, $\lambda_{\text{фл}}$ 440 нм, T 293 К

Условия определения: калий-фосфатный буфер (рН 7,1), [ThrDP] $1 \cdot 10^{-5}$ М, [E] $1,5 \cdot 10^{-6}$ М

Соединение	$\lambda_{\text{фл}}^{\text{макс}}$, нм	$\tau_{\text{фл}}$, нс	K^i , M^{-1}	K^t , M^{-1}
ThrDP	437	1,80	3,7	3,5
ThrDP*	424	3,65	—	—
ThrDP + α PDC	436	1,83	47**	3,4

* В этаноле.

** Определено из зависимости $W^i = f(c)$ в области малых концентраций пирувата.

чем для комплекса hPDC—TNS [4]. Исходя из этого, для апоформы фермента можно ожидать наличия трех мест сорбции зонда, два из которых расположены в области активного центра. Из табл. 2 видно, что максимум спектра флуоресценции комплекса α PDC—TNS расположен в более длинноволновой области, чем для комплекса hPDC—TNS. При этом значения степени поляризации в обоих случаях практически одинаковы, а затухание свечения является биэкспоненциальным. Длительность флуоресценции излучающих центров меньше для зонда, связанного с α PDC, чем с hPDC. На основе полученных результатов можно констатировать, что все три центра связывания TNS с белком в явном виде в параметрах флуоресценции не проявляются. Молекулы зонда имеют жесткую фиксацию на холо- и апоферменте, однако в последнем случае микроокружение зонда более полярно и, возможно, флуорофоры более доступны молекулам воды. Полярность микроокружения зонда существенно не изменяется при добавлении в раствор ионов Mg^{2+} (табл. 2).

Сравнивая флуоресцентные характеристики комплексов hPDC—TNS, α PDC— Mg^{2+} —TNS и α PDC— Mg^{2+} —Pyr—TNS (табл. 2), легко заметить, что спектр флуоресценции последнего смещен на 6—7 нм в длинноволновую область по сравнению со спектром TNS, связанного с hPDC. Отсюда следует, что микроокружение в области сорбции кофермента значительно более полярное, чем область сорбции пирувата. Вместе с тем и комплекс α PDC— Mg^{2+} —Pyr—TNS имеет два типа излучающих центров, различающихся временами затухания флуоресценции (табл. 2) и имеющих близкие положения максимумов спектров, т. е. как для комплекса hPDC—TNS, так и для комплекса α PDC— Mg^{2+} —Pyr—TNS имеются два типа неэквивалентных излучающих центров зонда, причем длительность флуоресценции зондов обоих типов примерно в одинаковой степени чувствительна к присутствию субстрата и кофермента (табл. 2). По этой причине можно полагать, что связанный с белком в его активном центре зонд существует в двух конформациях.

Из табл. 2 видно, что при связывании зонда в месте сорбции пирувата спектры флуоресценции в большей мере зависят от длины волны возбуждения. Степень поляризации и длительность флуоресценции имеют меньшие значения, чем при связывании зонда в месте сорбции тиаминдифосфата. Это означает, что более гидрофобное микроокружение субстрата подвижнее, чем микроокружение кофермента.

Учитывая описанные выше данные по влиянию субстрата и кофермента на комплекс α PDC—TNS, можно предположить, что пируват связывается с активным центром фермента даже в отсутствие тиаминдифосфата. Вероятно, пируват, как это предсказывалось в работе [2], непосредственно участвует в организации активного центра путем обеспечения вместе с ионами металла лучшей фиксации тиаминдифосфата на белке.

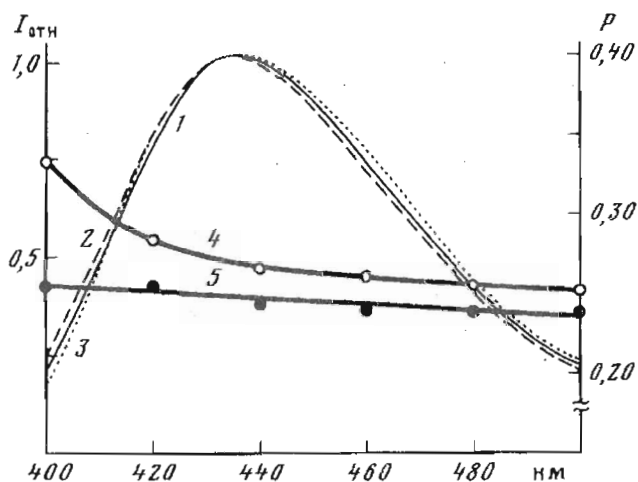


Рис. 2. Спектры флуоресценции (1—3) и степени поляризации излучения (4, 5) тиохромдифосфата в свободном состоянии (3) и в комплексе ThrDP—aPDC (1, 2, 4, 5). Условия определения см. в подписи к табл. 3. Концентрации белка 0,5 (1, 5) и 1,6 мг/мл (2, 4), $\lambda_{возб}$ 370 нм

Важная дополнительная информация об организации активного центра в присутствии пирувата может быть получена при исследовании люминесценции пируватдекарбоксилазы, модифицированной тиохромдифосфатом.

Люминесцентные исследования пируватдекарбоксилазы, модифицированной тиохромдифосфатом

Спектрально-кинетические и поляризационные характеристики тиохромдифосфата, связанного с aPDC, приведены в табл. 3 и на рис. 2. Спектр флуоресценции лиганда при связывании с белком несколько смещается в коротковолновую сторону (рис. 2). При этом его положение, так же как и значения степени поляризации, существенно зависит от концентрации белка. В случае относительно низких концентраций, когда в растворе находятся преимущественно биологически активные димеры пируватдекарбоксилазы, изменения спектра флуоресценции тиохромдифосфата, вызванные взаимодействием с ферментом, выражены в наименьшей степени. Степень поляризации флуоресценции имеет низкие значения и практически не изменяется в пределах спектра излучения (рис. 2). Затухание флуоресценции лиганда моноэкспоненциально как в растворе, так и в комплексе с ферментом, причем значения τ в обоих случаях одинаковы (1,80 нс) и не зависят от длины волны флуоресценции.

При концентрациях белка в растворе более 1,5 мг/мл спектр флуоресценции связанного с ним тиохромдифосфата заметно смещается в коротковолновую область и степень поляризации излучения возрастает. При этом увеличение степени поляризации флуоресценции существенно больше при регистрации излучения на коротковолновом краю спектра.

Низкие значения степени поляризации флуоресценции тиохромфосфата, связанного с aPDC, а также незначительные различия в спектрах и значениях τ флуоресценции связанного и несвязанного лиганда, существенно отличающиеся от параметров флуоресценции в этаноле (табл. 3), указывают на значительную подвижность хромофоров и их экспонированность в растворитель. Возможно, двумя такими центрами связывания тиохромдифосфата с aPDC являются дифосфатная группа и атом N-3 пиримидинового цикла. Однако, учитывая полученные результаты, можно сделать вывод, что лиганд связывается с молекулой белка только дифосфатной группой, поскольку в этом случае хромофорная часть моле-

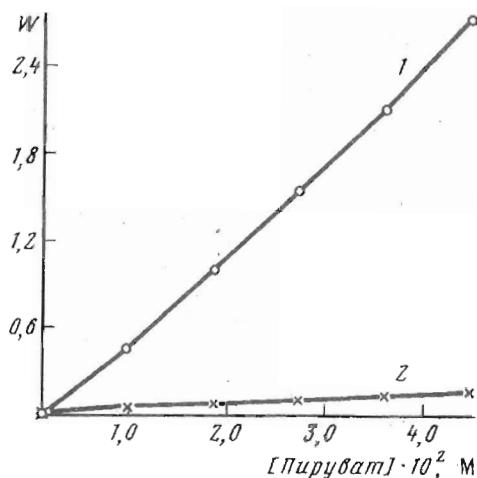


Рис. 3. Зависимость эффективности тушения (W) флуоресценции комплекса ThrDP— α PDC от концентрации пирувата, измеренная по изменениям интенсивности (1) и τ (2). Условия определения см. в подписи к табл. 2

кулы будет наиболее экспонированной в растворитель и иметь большую свободу вращений, а следовательно, низкие значения степени поляризации. Одновременное связывание данной флуоресцентной метки двумя участками, вероятно, невозможно из-за стерических факторов, т. е. значительных различий в геометрии молекул тиаминдифосфата и тиохромдифосфата. Этого результата можно было ожидать, поскольку в отличие от тиаминдифосфата молекула тиохромдифосфата является π -сопряженной и плоской.

Появление в растворе белковых ассоциатов более высокого порядка, чем димеры, очевидно, приводит к уменьшению подвижности флуоресцентной метки и ограничению доступа растворителя, т. е. уменьшению полярности ее микроокружения. Поскольку тиохромдифосфат связан с α PDC в активном центре фермента, вероятно, при ассоциации молекул белка блокируется доступ к активному центру субстрата, т. е. ослабляются процессы диффузии субстрата и продуктов реакции. Данные обстоятельства могут быть основной причиной уменьшения ферментативной активности пируватдекарбоксилазы при образовании тетрамеров.

Внесение в раствор, содержащий комплекс α PDC—ThrDP, пирувата приводит к тушению флуоресценции метки (рис. 3). Тушение флуоресценции проявляется в уменьшении интенсивности и длительности свечения и заметно не изменяет положения спектра излучения (табл. 3). Построенные в координатах Штерна—Фольмера зависимости эффективности тушения W^i и W^t от концентрации пирувата не совпадают (рис. 3). Интенсивность флуоресценции при добавлении пирувата уменьшается в большей степени, чем τ . При этом зависимость $W^i = f(c)$ не линейна, что свидетельствует о наличии нескольких механизмов или процессов тушения, а именно лимитируемого диффузией динамического и статического тушения. Близкие значения констант K^t динамического тушения для связанного с ферментом и свободного тиохромдифосфата (табл. 3) подтверждают сделанное выше заключение о легкой доступности флуорофоров растворителю.

Высокие значения константы тушения K^i , значительно превосходящие K^t (табл. 3), позволяют сделать вывод, что связанные с белком независимо друг от друга тиохромдифосфат и пируват непосредственно контактируют, образуя нефлуоресцирующий комплекс. Поэтому есть все основания полагать, что независимо от присутствия кофермента пируват эффективно связывается в активном центре пируватдекарбоксилазы.

Совокупность рассмотренных выше результатов флуоресцентных исследований позволяет предположить модель организации активного центра фермента, показанную на рис. 4.

Предложенная схема учитывает существующие модели [1], согласно которым

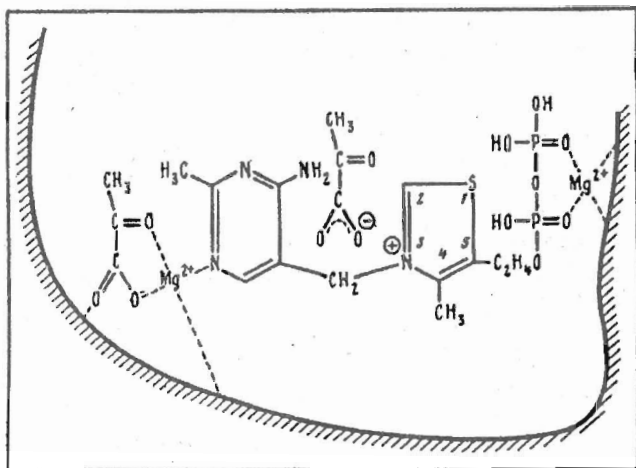


Рис. 4. Модель организации активного центра пируватдекарбоксилазы

дифосфатная группа и атом азота в первом положении тиаминдифосфата обеспечивают связывание кофермента с апоферментом. Кроме того, предполагается участие субстрата в организации активного центра холофермента за счет дополнительной фиксации пиримидинового компонента. Весьма важен вопрос об аминокислотном составе микроокружения активного центра hPDC. Хотя его решение представляет собой предмет отдельной работы, можно предположить, что в связывании кофермента и субстрата с aPDC участвуют остатки гистидина. Данное предположение базируется на результатах работ [9, 10], в которых методом гигантского комбинационного рассеяния показано наличие взаимодействия тиаминдифосфата и пирувата с гистидином и имидазолом.

Экспериментальная часть

В работе использовали NADH и наборы для электрофореза (Reanal, Венгрия); TNS, пируват (Sigma, США); тioxромдифосфат (Fluka, Швейцария); сефадекс G-25 (Pharmacia, Швеция). ThrDP получали окислением ThDP $K_3[Fe(CN)_6]$ по методике [11]. Остальные реактивы — марки ос. ч. или х. ч. отечественного производства.

Пируватдекарбоксилазу из пивных дрожжей выделяли согласно методике [12]. Чистоту ферментного препарата контролировали методом диск-электрофореза в 7%. ПААГ с использованием трис-глицинового буфера, pH 8,3, на приборе фирмы Reanal (Венгрия), модель 69. Белок определяли по методу Лоури [13] и спектрофотометрически по поглощению при 280 нм.

Удаление тиаминдифосфата из холопируватдекарбоксилазы и обессоливание фермента проводили на колонке с сефадексом G-25 ($1,7 \times 40$ см) при pH 8,9 в соответствии с работой [14]. Рекомбинацию апофермента с 20 мМ тioxромдифосфатом в присутствии 50 мМ Mg^{2+} осуществляли в 20 мМ натрий-фосфатном буфере при pH 6,8.

Стационарные спектры флуоресценции регистрировали на приборе СДЛ-2 (ЛОМО). Коррекцию канала регистрации на спектральную чувствительность производили с использованием стандартной вольфрамовой лампы ТРШ-2850.

Измерение длительности свечения выполнено на импульсном флуориметре, основные детали которого описаны в работе [15]. Анализ регистрируемых кривых затухания, с учетом длительности возбуждающих импульсов и функции отклика системы регистрации, проводили с использованием специально разработанной

программы [16], использующей оптимизационный метод Пауэлла [17]. Функцию затухания флуоресценции представляли в виде

$$F(t) = \sum_{i=1}^3 A_i e^{-\frac{t}{\tau_i}}$$

где A_i , τ_i — амплитуда и длительность затухания свечения i -й компоненты. Представление функции $F(t)$ одной или суммой нескольких экспонент осуществляли исходя из минимума χ^2 и других статистических критериев, подробно описанных в работе [18].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кочетов Г. А. Тиаминовые ферменты. М.: Наука, 1978. 234 с.
2. Schellenberger A. // Chem. Ber. 1990. V. 123. P. 1489—1494.
3. Kluger R., Trachsel R. // Bioorg. Chem. 1990. V. 18. P. 136—143.
4. Ullrich J., Donner I. // Z. Physiol. Chem. 1970. B. 351. S. 1030—1034.
5. Williamson J. R., Kreisberg R. A., Felts P. W. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1966. V. 56. № 1. P. 247—254.
6. Schellenberger A. // Wiss. Z.: Martin-Luter-Univ., Math.-Wiss. Reihe. 1969. B. 18. S. 313—339.
7. Ullrich J. // Ann. N. Y. Acad. Sci. 1982. V. 378. P. 287—305.
8. Hoffmann P. // J. Bact. 1991. V. 173. P. 7963—7971.
9. Maskevich S. A., Kivach L. N., Podtynchenko S. G., Zanevsky G. V. // Abstracts XIIIth International Conference of Raman Spectroscopy. Wurzburg, Germany. 1992. P. 110—111.
10. Strekal N. D., Gachko G. A., Kivach L. N., Maskevich S. A. The Study of Active Center of Pyruvate Decarboxylase from Brever's Yeast by SERS // Abstracts XIIIth International Conference of Raman Spectroscopy. Wurzburg, Germany. 1992. P. 110—111.
11. Экспериментальная витаминология // Ред. Ю. М. Островский. Минск: Наука и техника, 1979. С. 221.
12. Клящицкий Б. А., Позднев В. Ф., Митина В. Х., Воскобоев А. И., Черникович И. П. // Биоорганическая химия. 1980. Т. 6. № 10. С. 1572—1579.
13. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. № 1. P. 265—275.
14. Ullrich J., Wittotf J. H., Gubler C. J. // Biochim. et biophys. acta. 1966. V. 113. P. 595—604.
15. 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.
16. 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.
17. Химмельблау Д. Основы нелинейного программирования. М.: Мир, 1976. 576 с.
18. O'Connor D. V., Phillips D. Time-Related Single Photon Counting. Acad. Press, 1984. 283 p.

Поступила в редакцию
3.II.1993
После доработки
6.VII.1993

*S. A. Maskevich, A. A. Maskevich, L. N. Kivach,
I. P. Chernikevich *, S. V. Zabrodskaja *, D. A. Oparin **

**SPECTROSCOPIC INVESTIGATION OF STRUCTURE
AND INTRAMOLECULAR MOBILITIES PYRUVATE
DECARBOXYLASE FROM BREWER'S YEAST**

*Institute of Biochemistry, Yanka Kupala State University,
Academy of Sciences of Belarus, Grodno*

Steady-state and time-resolved fluorimetry were used to study the properties of holo- and apopyruvate decarboxylase (EC 4.1.1.1, PDC) from brever's yeast after interaction with substrate (pyruvate), cofactor (thiamine diphosphate, ThDP) and Mg^{2+} ions. The analysis of the enzyme's intrinsic fluorescence as well as of its complex with the probe 2-(*p*-toluidinylnaphthalene)-6-sulphonate (TNS) revealed that ThDP was found at the polar region of the PDC active sites, inducing a decrease in the mobility of the protein's nearest surroundings. The fluorescent probe had three different sites of binding to the protein apoform, two of which being located at the catalytic site and having different rotation freedom.

The study of the PDC complex with thiochrome pyrophosphate, a ThDP structural analogue, pointed to the occurrence of a non-polar region of the enzyme active site for pyruvate absorption besides the polar region. The binding of pyruvate to the protein does not depend upon the cofactor's binding. On the basis of the fluorescent studies a model of the ThDP and pyruvate arrangement at the PDC active site is suggested.