



УДК 577.158.02

ИНГИБИРОВАНИЕ ЦИТОХРОМА  $b_2$  МОНО- И ДИБРОМПИРУВАТОМ

Кулис Ю. Ю., Кадзяускаене К. В., Швирмицкас Г.-Ю. С.

Институт биохимии Академии наук Литовской ССР, Вильнюс

Исследована кинетика ингибирования цитохрома  $b_2(L(+)$ -лактат: цитохром-*c*-оксидоредуктазы) из дрожжей *Hansenula anomala* моно- и дибромпируватом в зависимости от редокс-состояния. Инактивация окисленного фермента под действием бромпроизводных протекает в 10–60 раз медленнее инактивации восстановленного фермента. Константа скорости модификации восстановленного цитохрома  $b_2$  дибромпируватом в 2–3 раза выше, чем для монобромпирувата, а константа ингибирования для дибромпроизводного в 4 раза выше. *n*-Хлормеркурибензоат (до 100 мкМ) и иодацетамид (1 мМ) не инактивируют цитохром  $b_2$  вне зависимости от редокс-состояния. Исследована кинетика реакций бромпроизводных с цистеином и меркаптоэтанолом. Бромпроизводные не реагируют с цистином, лизином и имидазолом. Полученные кинетические данные указывают на то, что в активном центре цитохрома  $b_2$  находится тиоловая группа, которая в окисленном ферменте модифицируется значительно труднее, чем в восстановленном.

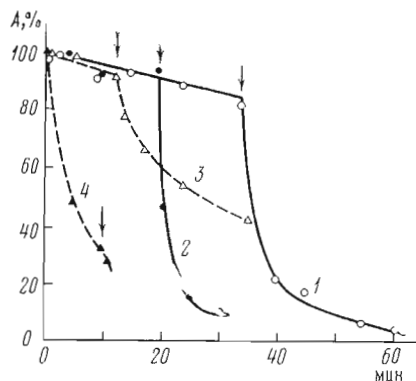
Перенос электронов в флавопротеинах протекает путем образования промежуточных продуктов [1]. Наиболее стабильны формы фермента, содержащие полностью окисленный или восстановленный кофактор [2]. Эти формы различаются спектральными свойствами [1, 2], термической устойчивостью [3] и другими физико-химическими параметрами [4]. Наличие кофактора в различном редокс-состоянии должно отразиться на строении активного центра фермента, что может быть исследовано путем применения специфических ингибиторов.

Цитохром  $b_2(L(+)$ -лактат: цитохром-*c*-оксидоредуктаза, КФ 1.1.2.3) является сложным флави- и гемсодержащим ферментом [5]. Фермент образует две устойчивые формы с окисленными и восстановленными кофакторами [6]. Для цитохрома  $b_2$  недавно найден необратимый специфический ингибитор монобромпируват [7], поэтому этот фермент удобен для исследования активного центра флавопротеинов. Цель настоящей работы — ингибирование моно- и дибромпируватом цитохрома  $b_2$  из дрожжей *Hansenula anomala* в различном редокс-состоянии.

При инкубации окисленного цитохрома  $b_2$  с 21,6 мМ монобромпируватом ферментативная активность падает на 19,1% в течение 35 мин (рис. 1). Добавление в инкубационную среду 4,3 мМ *D, L*-лактата приводит к значительному увеличению скорости инактивации фермента (рис. 1). Повторение эксперимента с другой порцией цитохрома  $b_2$  дает такой же результат (рис. 1).

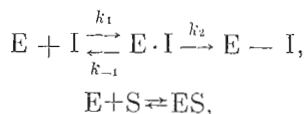
Дибромпируват инактивирует окисленный фермент значительно быстрее монобромпирувата (рис. 1). Восстановление цитохрома  $b_2$  в этом случае также ускоряет необратимое ингибирование. Различие в скорости

Рис. 1. Изменение ферментативной активности окисленного и восстановленного цитохрома  $b_2$  под действием монобромпирувата (1, 2) или дибромпирувата (3, 4). Концентрация фермента на один гем 0,17 (1, 3, 4) или 0,2 мкМ (2). Стрелки показывают момент восстановления фермента  $D, L$ -лактатом (4,3 мМ). Концентрация монобромпирувата 21,6 мМ (1, 2), дибромпирувата 0,76 (3) и 5,4 мМ (4); 0,1 М фосфатный буфер, pH 7,2; 20° С



инактивации окисленного и восстановленного фермента более четко проявляется при использовании меньшей концентрации (0,76 мМ) ингибитора (рис. 1).

Инактивация восстановленного цитохрома  $b_2$  дибромпируватом на 80–90% протекает как реакция первого порядка. Увеличение концентрации модификатора ускоряет реакцию, а увеличение концентрации  $D, L$ -лактата от 8 мкМ до 4,3 мМ приводит к замедлению процесса инактивации (рис. 2). Экспериментальные данные хорошо линеаризуются в координатах обратных величин, что согласуется со схемой



согласно которой

$$\frac{1}{k} = \frac{1}{k_2} \left[ \frac{K_{in} \left( \frac{[S]}{K_s} + 1 \right)}{[I]} + 1 \right],$$

где  $K_{in} = (k_{-1} + k_2) / k_1$ ,  $K_s$  — константа диссоциации фермент-субстратного комплекса.

Данные, полученные согласно этой схеме (таблица), показывают, что константа скорости необратимого ингибирования ( $k_2$ ) восстановленного цитохрома  $b_2$  дибромпируватом при 20° С близка по величине к соответствующей константе скорости ингибирования монобромпируватом при 30° С [7]. Отсюда, с учетом различия в температурах, реакционность дибромпирувата в 2–3 раза выше. Константа ингибирования ( $K_{in}$ ) дибромпируватом, однако, в 4 раза больше  $K_{in}$  для монобромпирувата. Различия также наблюдаются в значениях  $K_s$ , что может быть объяснено использованием  $D, L$ -лактата в настоящей работе и  $L$ -лактата в работе [7], а также специфичкой фермента, выделенного из разных дрожжей.

Для количественной оценки эффективности ингибирования в случае окисленного фермента использованы константы скорости первого поряд-

#### Кинетические параметры реакции цитохрома $b_2$ и цистеина с моно- и дибромпируватом\*

Реагент	Восстановленный фермент			Окислительный фермент		Реакция цистеина, $k_{II}$ , мм <sup>-1</sup> ·мин <sup>-1</sup>
	$K_{in}$ , мм	$K_s$ , мм	$k_2$ , мин <sup>-1</sup>	$k_I \cdot 10^3$ , мин <sup>-1</sup>	концентрация реагента, мм	
Монобромпируват	0,8 **	0,16 **	0,42 **	5,4	21,6	0,51
Дибромпируват	3,8	3,4	0,43	6,7	0,76	1,01

\*  $D, L$ -Лактат, 0,1 М фосфатный буфер, pH 7,2; 20° С. Стандартная ошибка 9–14%.

\*\* Цитохром  $b_2$  из пекарских дрожжей,  $L(+)$ -лактат, 30° С [7].

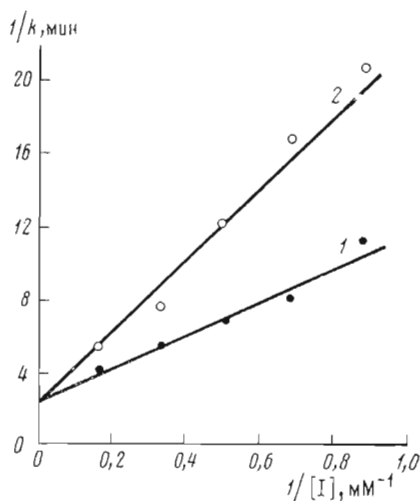


Рис. 2

Рис. 2. Зависимость константы скорости ингибирования восстановленного цитохрома  $b_2$  от концентрации дибромпирувата. Концентрация  $D,L$ -лактата 8 мкМ (1) и 4,3 мМ (2), остальные условия см. на рис. 1

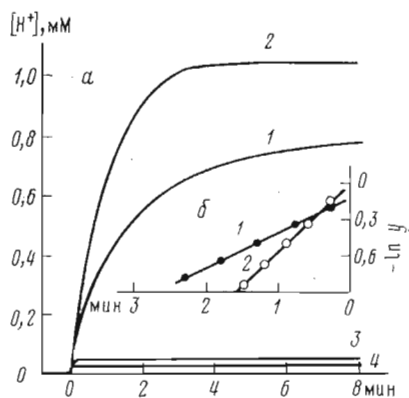


Рис. 3

Рис. 3. *a* – кинетика образования кислоты в реакции монобромпирувата (1, 3) или дибромпирувата (2, 4) с  $L$ -цистеином (1, 2) или  $L$ -цистином (3, 4). Концентрация  $L$ -цистеина и  $L$ -цистина 1 мМ, монобромпирувата 0,45 мМ (1, 3), дибромпирувата 0,52 мМ (2, 4); 0,1 М КСl, рН 7,2; 20° С; *б* – трансформация кинетических данных в координатах реакций второго порядка.

$$(\ln y = \ln a(2b-x)/b(2a-x),$$

где  $a$  и  $b$  – начальные концентрации  $L$ -цистеина и моно- (1) или дибромпирувата (2) соответственно,  $x$  – текущая концентрация ионов водорода)

ка ( $k_1$ ), рассчитанные из начальной скорости падения активности (рис. 1). Полученные значения констант (таблица), а также данные, приведенные на рис. 1, показывают, что ингибирование окисленного фермента протекает приблизительно в 10–60 раз медленнее, чем восстановленного.  $n$ -Хлормеркурибензоат, а также иодацетамид не инактивируют цитохром  $b_2$  в течение более 30 мин вне зависимости от редокс-состояния.

Реакция бромпроизводных пирувата с  $L$ -цистеином сопровождается выделением двух ионов водорода на 1 моль моно- или дибромпирувата (рис. 3). Данные реакции хорошо линейризуются в координатах второго порядка. В случае дибромпирувата константы скорости в 2 раза выше, чем в случае монобромпирувата (таблица).

Меркаптоэтанол реагирует с монобромпируватом, выделяя один ион водорода на моль соединения, а дибромпируват – с выделением двух ионов. Константы скорости реакции равны соответственно 1,30 и 0,93 мМ<sup>-1</sup>мин<sup>-1</sup>.

Моно- и дибромпируват не реагируют с  $L$ -цистином (рис. 3). Незначительное образование ионов водорода в начале реакции зависит от способа подготовки раствора и обусловлено частичным гидролизом дисульфида. Для проверки возможности реакции бромпирувата с  $L$ -цистином без образования кислоты были применены смеси цистина и цистеина. Скорость образования ионов водорода при этом равна скорости реакции с цистеином.

Другие сильнооуклеофильные соединения, остатки которых встречаются в активных центрах ферментов ( $L$ -лизин,  $L$ -гистидин), не реагируют в данных условиях с бромпроизводными пирувата.

Реакции бромпируватов с нуклеофильными реагентами показывают, что в мягких условиях реагируют только соединения, обладающие свободной SH-группой. Дибромпируват в 2 раза более реакционноспособен,

чем монобромпируват. Ингибирование фермента дибромпируватом, так же как и монопируватом, протекает через предварительное образование специфического комплекса. Скорость необратимого ингибирования восстановленного цитохрома  $b_2$  в случае дибромпирувата в 2–3 раза выше монобромпроизводного (таблица). В совокупности полученные данные указывают на то, что в активном центре цитохрома  $b_2$  находится тиоловая группа. В окисленном ферменте эта группа модифицируется значительно труднее, что может быть обусловлено конформационным изменением активного центра или образованием связей между SH-группой и электрофильными остатками, в результате чего нуклеофильность тиолового остатка в окисленном ферменте понижена и скорость модификации бромпируватом уменьшается. Это подтверждается уменьшением различия в скоростях модификации восстановленного или окисленного фермента в случае использования более жесткого и менее специфического модификатора — дибромпирувата. Отсутствие ингибирования цитохрома  $b_2$  типичными сульфгидрильными реагентами (*n*-хлормеркурибензоатом, иодацетамидом) указывает на то, что тиоловый остаток в активном центре фермента освобождается только при действии специфических ингибиторов, подстраивающих активный центр.

Аминокислотная последовательность молекулы цитохрома  $b_2$  показывает, что один остаток цистеина находится рядом с остатком триптофана-22 [8]. Этот остаток расположен в консервативной части полипептидной цепи [8] и, как следует из люминесцентных измерений, находится рядом с флавиномононуклеотидом [9]. Поэтому логично предположить, что именно эта сульфгидрильная группа модифицируется бромпируватами в цитохроме  $b_2$ .

### Экспериментальная часть

Фермент выделен из дрожжей *Hansenula anomala* в ВНИИ прикладной энзимологии по измененному методу [10]. Суспензию кристаллического цитохрома  $b_2$  в растворе сульфата аммония, содержащего 0,3 M *D, L*-лактат, центрифугировали при 10000 *g* в течение 10 мин при охлаждении (ультрацентрифуга К-24, Janetzki, ГДР). Осадок растворяли в минимальном количестве 0,1 M фосфатного буфера, pH 7,2, содержащего 0,1 mM EDTA, и осаждали сульфатом аммония (80% насыщение). Центрифугирование и осаждение повторяли 4 раза. На конечной стадии очистки осадок растворяли в 2–4 мл фосфатного буфера. Спектры поглощения разбавленного раствора фермента показывают, что после этих операций цитохром  $b_2$  находится в окисленном состоянии. Фермент восстанавливается при добавлении в раствор 2 mM *D, L*-лактата. Концентрация фермента, выраженная относительно одного гема ( $\epsilon_{423}^{\text{red}}$  183 mM<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup> [11]), составляла 8,6 или 10 мкМ.

Бромпирувиноградную кислоту марки ч. (Ереванский завод химических реактивов, СССР) перекристаллизовывали из сухого хлороформа (т. пл. 51–53° С). Химический сдвиг в спектре ПМР (R=22, Hitachi, Япония) протонов в группе  $\text{CH}_2\text{Br}$  — 4,38 м. д. относительно тетраметилсилана ( $\text{CDCl}_3$ ). Для синтеза дибромпирувиноградной кислоты пирувиноградную кислоту марки ч. (Ереванский завод химических реактивов, СССР) перегоняли в вакууме и растворяли в смеси уксусной кислоты и воды, 9:1 (по объему), с образованием 10% раствора. В охлажденную льдом смесь по каплям добавляли бром (1 моль на 1 моль пирувиноградной кислоты) с такой скоростью, чтобы температура не превышала 30° С. Завершение реакции определяли по охлаждению смеси. В смесь добавляли хлороформ, в результате чего выпадали кристаллы. Кристаллы высушивали и полученное вещество еще дважды перекристаллизовывали из сухого хлороформа (т. пл. 74–76° С). Вычислено, % С 13, 65; Н 1,52; Br 60, 58. Найде-

но, %: С 13,52; Н 1,62; Вг 61,20. Химический сдвиг протонов группы  $\text{CNBr}_2$  в  $\text{CDCl}_3$  равен 6,65 м.д.

Ферментативную активность цитохрома  $b_2^*$  определяли спектрофотометрическим методом (Specord UV VIS, ГДР) при 420 нм и температуре 30°С [7]. Состав среды: 1 мМ феррицианид калия, 23,6 мМ *D,L*-лактат в 0,1 М фосфатном буфере. Кажущаяся молекулярная активность фермента в этих условиях была равна 833 с<sup>-1</sup>.

Реакции моно- и дибромпирувата с *L*-цистеином (марка ч., Ереванский завод химических реактивов, СССР), *L*-цистином, *L*-имидазолом, *L*-лизинном (Reanal, Венгрия) и меркаптоэтанолом (Serva, ФРГ) исследовали при постоянном значении рН 7,2 в 0,1 М КСl с помощью рН-стага ТТТ-3 (Radiometer, Дания). Объем термостатированной ячейки 7 мл, бюретки 0,25 мл. Титровали 0,1 М КОН при 20°С. Концентрация нуклеофильных реагентов 1 мМ, моно- или дибромпирувата 0,45—0,52 мМ.

Ингибирование цитохрома  $b_2$  бромпроизводными пировиноградной кислоты проводили в термостатированной ячейке при 20°С в 0,1 М фосфатном буфере, рН 7,2, содержащем 0,1 М КСl. В 4,9 мл буфера, содержащего 2—22 мМ монобромпируват или 0,76—5,4 мМ дибромпируват, вводили 0,1 мл исходного фермента и через каждую минуту брали пробы объемом 0,11 мл для определения ферментативной активности. Аналогично проводили опыты в присутствии 8 мкМ или 4,3 мМ *D,L*-лактата. При использовании вместо бромпроизводных *n*-хлормеркурибензоата (Chemapol, Чехословакия) или иодацетамида (марка ч., Ереванский завод химических реактивов, СССР) концентрация реагентов составляла 1—100 мкМ или 1 мМ соответственно.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Bright H. J., Porter D. J. T. (1976) *The Enzymes*, 3 rd ed. (Boyer P. D., ed.), vol. 12, pp. 421—505, N. Y.
2. Mayhew S. G., Ludwig M. L. (1976) *The Enzymes*, 3 rd ed. (Boyer P. D., ed.), vol. 12, pp. 57—118, N. Y.
3. Nakamura S., Koga K. (1977) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 78, 806—810.
4. Ghisla S., Entsch B., Massey V., Husein M. (1977) *Eur. J. Biochem.*, 76, 139—148.
5. Gervais M., Groudinsky O., Risler Y., Labeyrie F. (1977) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 77, 1543—1551.
6. Appleby C. A., Morton R. K. (1954) *Nature*, 173, 749—752.
7. Mulet C., Lederer F. (1977) *Eur. J. Biochem.*, 73, 443—447.
8. Guiard B., Lederer F. (1977) *Eur. J. Biochem.*, 74, 181—190.
9. Risler J.-L. (1971) *Biochemistry*, 10, 2664—2669.
10. Baudras A., Spyridakis A. (1971) *Biochimie*, 53, 943—955.
11. Pajot P., Groudinsky O. (1970) *Eur. J. Biochem.*, 12, 158—164.

Поступила в редакцию  
23.I.1979

#### CYTOCHROME $b_2$ INHIBITION BY MONO AND DIBROMOPYRUVATE

KULYS J., KADZIAUSKIENE K., ŠVIRMITSKAS G.

*Institut of Biochemistry, Academy of Sciences of the Lithuanian SSR, Vilnius*

Inhibition kinetics of cytochrome  $b_2$  (*L*(+)-lactate: cytochrome *c* oxidoreductase) from the yeast *Hansenula anomala* by mono and dibromopyruvate is studied with respect to the redox state. Inactivation of the oxidized enzyme by bromoderivatives is 10-60 times slower than that of the reduced one. The rate constant of modification of reduced cytochrome  $b_2$  by dibromopyruvate is 2-3-fold higher than that of monobromopyruvate. Inhibition constant for dibromoderivative is 4 times higher. *p*-Chloromercuribenzoate (up to 100  $\mu\text{M}$ ) and iodoacetamide (1 мМ) do not inactivate cytochrome  $b_2$ , irrespectively of the redox state. Kinetics of the reactions of bromoderivatives with cysteine and mercaptoethanol is studied. Bromoderivatives do not react with cystine, lysine and imidazole. The kinetic data obtained indicate that in the active centre of cytochrome  $b_2$  there is a thiole group which is less susceptible to modification in the oxidized as compared to reduced enzyme forms.

\* Авторы приносят глубокую благодарность канд. биол. н. Р. К. Вайткявичюсу (ВНИИ прикладной энзимологии) за предоставление цитохрома  $b_2$ , а также д-ру биол. н. А. А. Ясайтису за полезное обсуждение работы.