

## АСИММЕТРИЯ СУБЪЕДИНИЦ АСПАРТАТАМИНОТРАНСФЕРАЗЫ В РАСТВОРЕ

В. М. Кочкина, Д. А. Кузнецов

**Введение.** Аспартаминотрансфераза (ААТ, КФ 2.6.1.1) представляет собой димер одинаковых по аминокислотной последовательности субъединиц с молекулярной массой около 47000. Индивидуальная субъединица обладает активным центром, функционирующим независимо от активного центра соседней субъединицы [1—3]. По поводу каталитической активности центров мнения разделились — одни считают, что они эквивалентны [1, 2], другими показана неэквивалентность функционирования активных центров [3, 4]. Для выяснения природы присущей ААТ из лентозоля сердца кур неэквивалентности субъединиц фермента в данной работе использовали свойство, которым обладает фермент — цветного рН-индикатора. Протонированной и непротонированной формам альдимида, образуемого коферментом с остатком лизина в белке, соответствуют полосы поглощения с максимумом при 430 нм (в кислой среде) и 360 нм (в щелочной). Если для двух субъединиц димерной молекулы белка в растворе существуют два различных значения  $pK'$  перехода протонированная  $\rightleftharpoons$  непротонированная форма ферментсвязанного пиридоксальфосфата (ПДФ), то это будет означать, что субъединицы неэквивалентны, несимметричны. В противном случае должно быть только одно значение  $pK'$  перехода, возможно, равное  $\sim 6,1$ — $6,3$ , как установлено для ААТ из сердца свиньи ранее [5, 6].

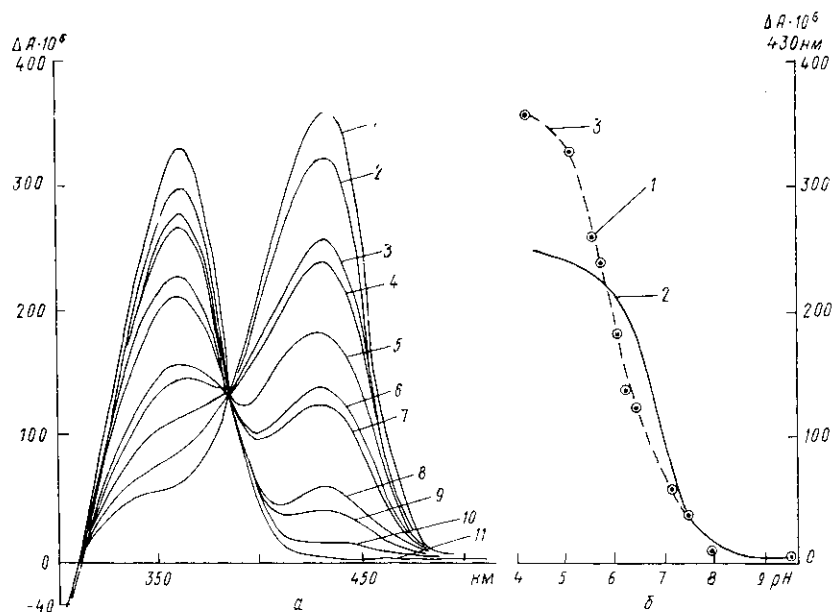
**Материалы и методы.** Фермент с удельной активностью 70000 ед/мг выделяли из сердца кур. Спектры кругового дихроизма (КД) снимали на дихрографе Mark III («Jobin Yvon», Франция) в кювете объемом 0,8 мл с длиной светового пути 1 см при чувствительности прибора  $2 \cdot 10^{-6}$  единиц эллиптичности на 1 мм шкалы диаграммы. Измерения проводили в 0,3 М калий-фосфатном буфере, рН от 4,3 до 9,5. Концентрация белка в пробе составляла 1 мг/мл. Математическую обработку спектров осуществляли с использованием критерия наименьших квадратов. Поиск оптимальных значений производили методом Розенброка с помощью ЭВМ «Электроника-70».

**Результаты и обсуждение.** Уже давно известно, что анионы, связываясь в активном центре ААТ [7], могут влиять на значение  $pK'$  ферментсвязанного ПДФ. По этой причине результаты определения значений  $pK'$  с использованием различных по аниону буферных растворов могли быть не достоверными. Поэтому в данном исследовании использовали только фосфатный буфер во всей области значений рН, так как ранее независимыми экспериментами было установлено, что фосфат-ион не оказывает влияния на значение  $pK'$  хромофора.

На рисунке, а, представлены спектры КД свободного фермента, полученные в одном из нескольких экспериментов. Спектры снимали в буферных растворах с рН 4,3 — 9,5 и интервалами 0,1—0,7 ед. рН. Видно, что рН-титрование дает серию спектров с хорошо выраженной изобестической точкой при 387 нм. В спектрах КД наблюдается положительная полоса дихроического поглощения с максимумами при 430 и 360 нм. Наибольшая амплитуда полосы с максимумом при 430 нм принадлежит раствору с рН 4,3, при 360 нм — рН 9,5. Наличие изобестической точки свидетельствует о том, что только две указанные формы присутствуют в растворе. В связи с тем, что протонированная форма фермента (максимум при 430 нм) при повышении рН раствора убывает нацело, для математической обработки использовали данные по изменению спектров именно этой формы фермента. Анализ спектральных данных с применением компьютерной техники проводили по двум схемам: в первой предполагается наличие одной, одинаковой для обеих субъединиц титрующейся группы, во второй — двух групп, различающихся для субъединиц. В качестве критерия укладки использовали стандартную дисперсию. Обработка данных показала существенный выигрыш при использовании схемы с двумя группами, поскольку различие в дисперсии составляло 2—4 раза. Для схемы с двумя различными группами теоретическая кривая наилучшим образом укладывается на экспериментальные точки, чего нельзя сказать о таковой для схемы с одной титрующейся группой. Набор экспериментальных точек (по убыванию поглощения при 430 нм) и теоретические кривые, соответствующие двух схемам, представлены на рисунке (б). Средние из нескольких экспериментов значения  $pK'_1 = 5,55 \pm 0,20$

(среднее из значений — 5,54; 5,52; 5,60),  $pK'_2 = 6,87 \pm 0,14$  (среднее из значений — 6,87; 6,90; 6,84).

Таким образом, впервые для этого класса ферментов установлено, что субъединицы димерной молекулы ААТ из пивного зерна обладают различающимися более чем на единицу значением  $pK'$  ферментсвязанного кофермента. Отсюда с неизбежностью следует, что субъединицы молекулы фермента асимметричны. Поскольку в данных экспериментах субстраты или их аналоги в реакционной среде не присут-



Спектры КД пиридоксальной формы свободного фермента (1 мг/мл) в 0,3 М калий-фосфатных буферах, рН (а): 1—4,30; 2—5,16; 3—5,50; 4—5,75; 5—6,10; 6—6,25; 7—6,45; 8—7,10; 9—7,40; 10—7,90; 11—9,50; и (б): 1—экспериментальные точки; 2—теоретическая кривая к схеме 1 (параметры схемы:  $pK'_1 = 6,61 \pm 0,34$ ;  $\sigma = 19,1$ ); 3—теоретическая кривая к схеме 2 (параметры схемы:  $pK'_1 = 5,54 \pm 0,25$ ;  $pK'_2 = 6,87 \pm 0,17$ ;  $\sigma = 13,6$ )

Circular dichroism spectra of the pyridoxal form of aspartate aminotransferase (1 mg/ml) in 0,3 M potassium phosphate, pH: а) 1—4,30; 2—5,16; 3—5,50; 4—5,75; 5—6,10; 6—6,25; 7—6,45; 8—7,10; 9—7,40; 10—7,90; 11—9,50; б) 1—experimental values; 2—a theoretical curve to scheme 1 (parameters of the scheme:  $pK'_1 = 6,61 \pm 0,34$ ;  $\sigma = 19,1$ ); 3—a theoretical curve to scheme 2 (parameters of the scheme:  $pK'_1 = 5,54 \pm 0,25$ ;  $pK'_2 = 6,87 \pm 0,17$ ;  $\sigma = 13,6$ )

ствовали, можно заключить, что установленная асимметрия субъединицы является первоначальной; она возникает в процессе ассоциации субъединиц в олигомер.

Полученные данные позволяют точнее интерпретировать результаты рентгеновского исследования кристаллов фермента при высоком разрешении.

## ASYMMETRY OF SUBUNITS OF ASPARTATE AMINOTRANSFERASE IN SOLUTION

V. M. Kochkina, D. A. Kuznetsov

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

### Summary

The apparent  $pK$  of enzyme-bound pyridoxal-5'-phosphate of subunits determined by circular dichroismic pH titration of the pyridoxal form of aspartate aminotransferase (EC 2.6.1.1) amounts to  $pK'_1 = 5.55 \pm 0.2$ ,  $pK'_2 = 6.87 \pm 0.14$ .

- Schlegel H., Christen P. The apo/holo hybrid of cytosolic aspartate aminotransferase preparation and studies on subunits interaction // Biochem. and Biophys. Res. Commun. — 1974. — 61, N 1. — P. 117—123.

2. *Boettcher B., Martinez-Carrion M.* Itemizing enzyme ligand interactions in native and half-active hybrid aspartate transaminase to probe site-site relationships // *Biochemistry*.— 1976.— 15, N 25.— P. 5657—5664.
3. *Arrio-Dupont M., Verge D.* Binding of substrates to aspartate aminotransferase. Evidence for a dissymmetrical binding // *Eur. J. Biochem.*— 1982.— 125, N 1.— P. 183—187.
4. *Кочкина В. М., Кузнецов Д. А.* Каталитические свойства аспартатаминотрансферазы // *Биохимия*.— 1986.— 51, № 6.— С. 921—925.
5. *Jenkins W., Yphantis D. A., Sizer I. W.* Glutamic aspartic transaminase // *J. Biol. Chem.*— 1959.— 234, N 1.— P. 51—57.
6. *Salerno C., Giartosio A., Fasella P.* Transaminases in vitamin B<sub>6</sub> pyridoxal phosphate / Ed. D. Dolphin.— New York: Wiley and Sons. 1986.— P. 117—168.
7. *Verge D., Tenu J.-P., Arrio-Dupont M.* Inorganic phosphate binding to apoaspartate aminotransferase // *FEBS Lett.*— 1979.— 100, N 2.— P. 265—268.

Ин-т молекуляр. биологии АН СССР, Москва

Получено 16.02.87