

ГЛУТАМАТДЕКАРБОКСИЛАЗА: СТРУКТУРА И КАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

© 2001 г. Б. С. СУХАРЕВА, Е. Л. ДАРИЙ,
Р. Р. ХРИСТОФОРОВ

*Институт молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта РАН,
Москва*

I. Введение. II. Пиридоксальные ферменты. III Декарбоксылазы аминокислот. IV. Глутаматдекарбоксылазы. V. Глутаматдекарбоксылаза из *E. coli*. VI. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Исследования глутаматдекарбоксылазы, проведенные ранее, были суммированы в нескольких обзорах [14, 47, 102]. В настоящей работе эти сведения дополнены современными данными. Глутаматдекарбоксылаза, содержащая в качестве кофермента пиридоксальфосфат, относится к пиридоксальным ферментам. Поэтому мы сочли целесообразным вначале рассмотреть общие особенности этих ферментов.

II. ПИРИДОКСАЛЕВЫЕ ФЕРМЕНТЫ

КЛАССИФИКАЦИЯ

Общая теория разнообразных превращений аминокислот, осуществляемых пиридоксальными ферментами, была впервые предложена А.Е.Браунштейном и М.М.Шемякиным [2, 3]. Согласно этой теории, возможность осуществления различных ПЛФ-зависимых ферментативных реакций обусловлена особенностями строения и свойств шиффовых оснований — промежуточных соединений аминокислоты с ПЛФ. При их образовании происходит снижение электрон-

Принятые обозначения: ПЛФ — пиридоксальфосфат, ПМФ — пиридоксальминфосфат, КД — круговой дихроизм, ДОФА — диоксифенилаланин, DSNa — додецилсульфат натрия.

Адрес для корреспонденции: e-mail: suhareva@genome.eimb.relarn.ru

ной плотности у C_{α} -атома аминокислоты благодаря наличию электроноакцепторных заместителей в α -положении: пиридоксалиденовой группы, присоединенной через аминный азот, и α -карбоксила, а также вследствие индуктивных воздействий. Связи между этим атомом и его заместителями сильно поляризованы и ослаблены. В зависимости от природы фермента и от строения аминокислоты активируется и отщепляется какой-либо заместитель при C_{α} -атоме. Наличием полярных заместителей в боковой цепи аминокислоты определяются ее дальнейшие превращения, приводящие к поляризации и возможности разрыва связей при β - и γ -углеродных атомах. Различные превращения аминокислот под действием ПЛФ-ферментов представлены на схеме (рис. 1). А.Е. Браунштейн [33] предложил классификацию пиридоксальных ферментов, основанную на локализации замещения или элиминирования заместителей у C_{α} -атома, C_{β} -атома или C_{γ} -атома аминокислоты (табл. 1). Согласно этой классификации реакция α -декарбоксилирования аминокислот связана с активацией и отщеплением α -карбоксильной группы и существенно отличается от реакции β -декарбоксилирования, при которой сначала активируется Н при C_{α} -атоме, а затем отщепляется дистальный карбоксил. Несколько позднее иную классификацию пиридоксальных ферментов сформулировали Метцлер, Икава и Снелл [75]. Они предложили подразделение ПЛФ-ферментов по трем основным типам реакций, исходя из природы того α -заместителя, который является первично уходящей группой. К первому типу относятся реакции, включающие диссоциацию α -водорода: β -элиминирование и β -замещение, трансминирование и рацемизация. Отщепление α -водорода в шиффовом основании приводит к образованию промежуточного хиноидного соединения, которое далее может подвергаться различным превра-

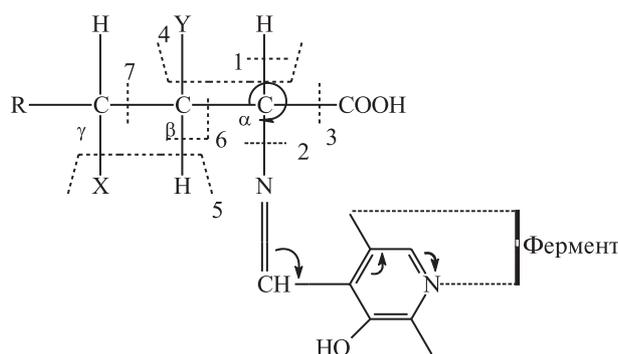


Рис 1. Активация химических связей в молекулах аминокислот под действием пиридоксальных ферментов [33].

Таблица 1
Классификация ПЛФ-ферментов по Браунштейну [33]

Разрываемые связи	Тип реакций	Фермент
	1. Элиминирование и замещение заместителей при C _α -атоме	
(1)* C _α -H	Диссоциация α-водорода. Рацемизация α-аминокислот.	Амиотрансферазы и ряд других ПЛФ- ферментов. Рацемазы.
(2) C _α -N и C _α -H	Трансаминирование, окислительное дезаминирование	Амиотрансферазы
(3) C _α -COOH	α-Декарбоксилирование	α-Декарбоксилазы
(6) C _α -C _β и C _α -H	α,β-Расщепление β- гидроксикаминокислот	Серин- и треонин десмолазы (альдолазы)
	2. Элиминирование и замещение заместителей при C _β -атоме	
(4) C _β -Y и C _α -H	Элиминирование H _α и полярного заместителя при C _β -атоме. Замещение полярного заместителя при C _β -атоме.	Триптофаназа, серин- и треониндегидратазы, триптофансинтаза. Цистатионинсинтаза-1, серинсульфгидраза.
(7) C _β -C _γ	β-Декарбоксилирование. Гидролитическое расщепление γ-кето-α-аминокислот.	Аспаргат β-декарбоксилаза. Кинурениназы.
	3. Элиминирование и замещение заместителей при C _γ -атоме	
(5) C _γ -X и C _β -H	Элиминирование H _β и полярного заместителя при C _γ -атоме. Замещение полярного заместителя при C _γ -атоме.	Гомосериндегидратаза, гомосеринизомераза (треонинсинтаза). Цистатионинсинтаза-2.

* Цифры в скобках соответствуют нумерации типов реакций в схеме на рис. 1.

щениям. Кроме того, существует еще одна группа реакций, в ходе которых происходит отщепление α -водорода: γ -элиминирование, γ -замещение, β -декарбоксилирование. Ко второму типу относятся реакции расщепления боковой цепи аминокислот. В процессе этих превращений боковая цепь шиффова основания может отщепиться в результате альдольного расщепления, или, напротив, присоединиться путем реакции β -конденсации. К третьему типу относится реакция, при которой разрывается связь между C_{α} -атомом и карбоксильной группой. Эта реакция катализируется декарбоксилазами аминокислот.

Дальнейшие исследования в области пиридоксалевого катализа, связанные с расшифровкой первичной структуры, привели к созданию современной классификации ПЛФ-ферментов. Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей показал, что большинство этих ферментов можно разделить на три различных семейства: α , β , и γ в зависимости от того углеродного атома, где происходит разрыв ковалентных связей. Самое большое из этих семейств — α семейство включает в себя ферменты, катализирующие такие превращения аминокислот, при которых разрываются ковалентные связи у C_{α} -атома. Сюда относятся различные аминотрансферазы, многие декарбоксилазы аминокислот, некоторые рацемазы и ряд других ферментов. Ферменты, относящиеся к β и γ семействам, катализируют реакции, в процессе которых происходит разрыв ковалентных связей при β -или γ -атомах углерода. Ферменты β семейства катализируют реакции β -замещения или β -элиминирования; это — серин и треонин дегидратазы, β -субъединица триптофан синтазы. В γ семейство входят ферменты, катализирующие реакции γ -замещения или γ -элиминирования, например, цистатионин γ -синтаза. [21]. Таким образом, современные исследования в значительной степени подтвердили прежние представления А.Е.Браунштейна [33]. Недавно были проанализированы 180 аминокислотных последовательностей, установленных для эукариотических ПЛФ-ферментов, выделенных из разных источников. Оказалось, что принадлежность к α , β или γ семейству не связана со скоростью эволюции этих ферментов [83].

ОБЩИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ СТРУКТУРЫ И МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ

Представление об общности происхождения пиридоксальных ферментов было выдвинуто Данатаном [41] на основании сходства в стереохимии протонов кофермента при различных каталитических превращениях аминокислот. Пиридоксальные ферменты являются олигомерами, построенными из нескольких, как правило, идентичных субъединиц. Установление пространственной структуры различных

аминотрансфераз [27, 32, 42], триптофан-синтазы [55], тирозин фенол-лиазы [25], орнитиндекарбоксилазы [76], триптофаназы [57] позволило заключить, что на уровне трехмерной структуры в их строении обнаруживается много сходных черт, хотя гомология первичной структуры этих ферментов выражена по-разному. В ранних работах установили, что субъединица ПЛФ-ферментов состоит из большого и малого домена. Наибольшее сходство наблюдается в структуре больших доменов, состоящих из восьми (или девяти) α -спиралей, упакованных вокруг семитяжевого β -слоя, там находятся кофермент-связывающие участки активного центра. Сходство обнаружено также и в строении малых доменов [58]. Аминокислотные остатки, связывающие ПЛФ, являются консервативными; среди них прежде всего следует упомянуть лизин, образующий альдиминную связь с альдегидной группой ПЛФ, и аспарагиновую кислоту, взаимодействующую с азотом пиридинового кольца кофермента [58, 77].

Начальные стадии всех реакций, катализируемых пиридоксальевыми ферментами, практически одинаковы. В отсутствие субстрата ПЛФ связан альдиминной связью с ϵ -аминогруппой лизина фермента, это соединение является внутренним альдиминном. При связывании аминокислоты происходит замена ϵ -аминогруппы лизина на α -аминогруппу субстрата. Таким образом, в результате реакции трансальдиминирования образуется внешний альдимин. Эта реакция проходит через стадию образования геминального диамина (тетраэдра), в котором как аминогруппа субстрата, так и аминогруппа лизина фермента оказываются связанными с C-4'-атомом ПЛФ. В ходе превращения внутреннего альдимина во внешний происходит перенос протона между двумя азотами (рис. 2). Реакция трансальдиминирования хорошо подтверждается временным исчезновением положительного КД в полосе поглощения кофермента при добавлении субстрата; после ее окончания КД появляется вновь [58].

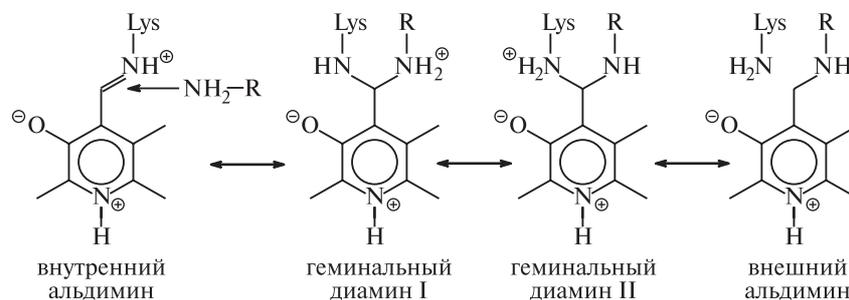


Рис. 2. Превращение внутреннего альдимина во внешний [58].

Специфичность ферментативной реакции определяется в ходе дальнейших превращений внешнего альдимины, согласно концепции Данатана [40]. По Данатану разрываема ПЛФ-ферментом связь в аминокислоте должна быть расположена в плоскости, перпендикулярной плоскости π -системы субстрат-коферментного имина. При этом достигается максимально возможное σ - π -перекрывание разрываемой связи и сопряженной π -системы имина кофермента, в результате чего энергия переходного состояния снижается до минимального значения. Кроме того, достигается геометрия, наиболее близкая к образуемому впоследствии планарному хиноидному производному, что сводит к минимуму молекулярные перемещения, необходимые для переходного состояния. Существуют три типа ориентации субстрата, в которых различные заместители при C_{α} -атоме находятся в положении, оптимальном для расщепления связи. При α -декарбоксилровании карбоксильная группа расположена в плоскости, перпендикулярной плоскости пиридинового кольца кофермента (рис. 3).

В результате отщепления одного из заместителей у C_{α} -атома внешнего альдимины образуется карбанион. Когда отрицательный заряд остается на C_{α} -атоме, последующее протонирование кофермент-субстратного комплекса приводит к образованию альдимины, который при гидролизе дает основной продукт реакции и свободный ПЛФ. В том случае, когда отрицательный заряд переносится на С-4'-атом кофермента, после протонирования комплекса образуется кетимин, далее гидролизующийся на кетокислоту и ПМФ. Таким образом, в

Разрываема связь располагается перпендикулярно π -системе шиффова основания

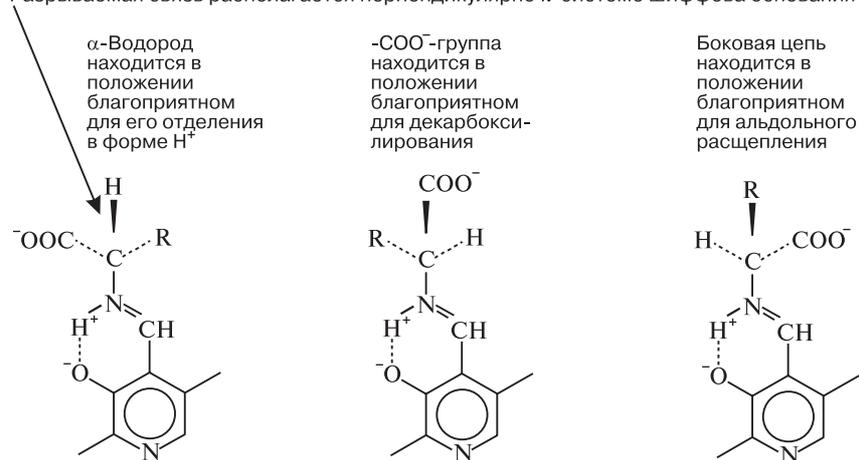


Рис. 3. Стереохимические аспекты пиридоксалевого катализа [40].

результате «ошибки протонирования» наряду с основной реакцией превращения субстрата происходит и побочная реакция — трансминирование кофермента. Вероятность осуществления основной реакции намного выше, чем побочной. Обе реакции на примере декарбоксилирования аминокислот представлены на рис. 4. Побочное (абортивное) трансминирование свойственно многим пиридоксальвым ферментам [71, 73] и для глутаматдекарбоксилазы подробно описано ниже (см. IV). Для изучения механизма действия ПЛФ-ферментов весьма продуктивным оказалось применение оптических методов исследования кофермент-субстратных комплексов, а именно, изучение их спектров поглощения, КД и флуоресценции.

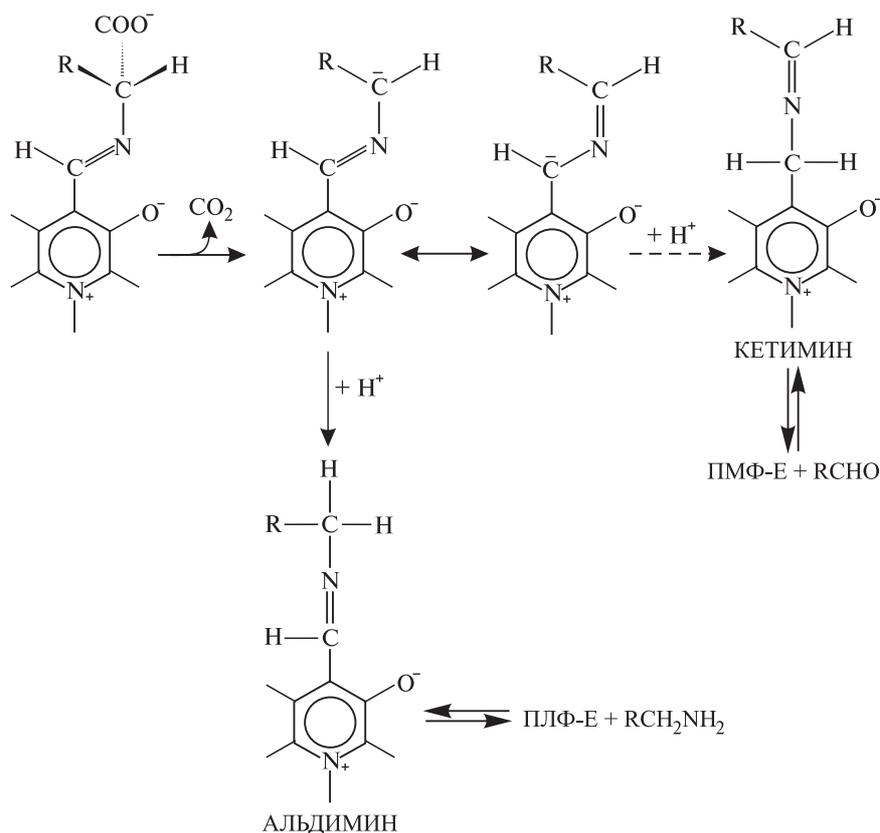


Рис. 4. Схема побочного трансминирования при декарбоксилировании аминокислот [73].

III. ДЕКАРБОКСИЛАЗЫ АМИНОКИСЛОТ

Декарбоксилирование аминокислот — процесс практически необратимый, приводящий к образованию биогенных аминов, что часто является конечной стадией биосинтеза аминосоединений. Все декарбоксилазы аминокислот за исключением аспарат β -декарбоксилазы осуществляют реакцию α -декарбоксилирования. В серии работ, выполненных Гейлом [48–50], в бактериях были найдены ферменты, катализирующие α -декарбоксилирование аргинина, гистидина, глутаминовой кислоты, лизина, орнитина с образованием, соответственно, агматина, гистамина, γ -аминомасляной кислоты, кадаверина и путресцина. Была исследована декарбоксилазная активность 14 разных штаммов *E. coli*, из которых были выбраны наиболее активные для каждой аминокислоты. Авторы изучили зависимость ферментативной активности от pH, температуры, состава среды и времени выращивания. Выяснилось, что образование фермента происходит в стационарной фазе роста бактерий при закислении среды. Кроме того, для образования фермента в большинстве случаев необходимо присутствие в питательной среде аминокислоты — субстрата реакции. Таким образом, декарбоксилазы являются адаптивными ферментами к кислой среде и к субстрату. На основании проведенных опытов были разработаны оптимальные условия выращивания культуры для получения активных препаратов фермента. Декарбоксилазы были получены в количестве, достаточном для определения активности манометрическим методом по выделению CO_2 . Продукты реакции — амины были выделены из реакционной смеси и идентифицированы. Образование аминов из аминокислот является защитным механизмом для предотвращения закисления среды в кишечнике [48]. Поскольку в ходе реакции происходит полное превращение аминокислоты, то препараты декарбоксилаз были использованы для количественного определения лизина, орнитина, гистидина, тирозина и глутаминовой кислоты в гидролизатах белков [49]. Для осуществления реакции декарбоксилирования аминокислота должна иметь свободную α -аминогруппу, свободную α -карбоксильную группу, а также удаленную от них полярную группу. Декарбоксилазы действовали лишь на L-изомер соответствующей аминокислоты и поэтому могли быть использованы для получения D-изомера из рацемата аминокислоты. Далее были разработаны методы получения частично очищенных ферментов и описаны их свойства: специфичность, оптимум pH, действие ингибиторов, определены K_m . Как правило, декарбоксилазы обладали высокой субстратной специфичностью. Некоторые из полученных декарбоксилаз удалось разделить на апофермент и кофермент, при этом было доказано, что

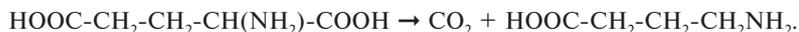
коферментом является ПЛФ [50]. ПЛФ в бактериальных декарбоксилазах аминокислот прочно связан с апоферментом, и препараты выделяются в форме холофермента. В большинстве случаев эти ферменты имеют сложную олигомерную структуру, число субъединиц обычно совпадает с числом остатков ПЛФ в макромолекуле [31]. Свойства декарбоксилаз аминокислот, выделенных из растений, напоминают свойства бактериальных декарбоксилаз [86].

Наряду с бактериальными и растительными ферментами были исследованы декарбоксилазы из тканей животных. Декарбоксилирование гистидина, триптофана, тирозина, ДОФА, цистеиновой кислоты было обнаружено в почках, печени, поджелудочной железе. Эти ферменты также стереоспецифичны, как и бактериальные, но отличаются от них небольшим содержанием в тканях и низкой активностью. Поэтому активность декарбоксилаз в тканях животных определяли не только манометрическими, но и фармакологическими методами. Кофермент в декарбоксилазах аминокислот связан рыхло, и ферменты выделяются частично в апоформе. Функция декарбоксилаз в организме животных заключается в образовании важных физиологически активных соединений — гистамина, адреналина, таурина. Действие орнитиндекарбоксилазы связано с процессами роста, регенерации и онкогенеза [30].

Установление первичной последовательности очищенных декарбоксилаз аминокислот позволило выявить степень гомологии их структуры [84]. На основании анализа полученных данных 54 ПЛФ-декарбоксилазы аминокислот были разделены на четыре группы, глутаматдекарбоксилаза относится ко второй группе (табл. 2).

IV. ГЛУТАМАТДЕКАРБОКСИЛАЗЫ

Глутаматдекарбоксилаза (L-глутамат-1-карбоксилиаза К.Ф. 4.1.1.15, glutamic acid decarboxylase, GAD) катализирует превращение глутаминовой кислоты в γ -аминомасляную кислоту и углекислый газ согласно следующему уравнению:



К настоящему времени глутаматдекарбоксилаза обнаружена в тканях животных, высших растений, а также в дрожжах и бактериях.

Глутаматдекарбоксилаза играет важную роль в деятельности центральной нервной системы. Ее субстрат, глутаминовая кислота, является медиатором процесса возбуждения, а продукт, γ -аминомасляная кислота, важнейшим медиатором процесса торможения в нейронах головного мозга. Глутаматдекарбоксилаза является скоростью-лимити-

Таблица 2
Группы ПЛФ-декарбоксилаз аминокислот [84]

Группа	Фермент	Источник
I	Глициндекарбоксилаза (КФ 1.4.4.2)	человек, курица, <i>Pisum sativum</i>
II	Глутаматдекарбоксилаза (КФ 4.1.1.15)	человек (GAD65, GAD67), кошка, крыса (GAD65, GAD67), мышь, <i>Drosophila melanogaster</i> , <i>E. Coli</i> (GAD α , GAD β)
	Гистидиндекарбоксилаза (КФ 4.1.1.22)	человек, крыса, мышь, <i>Drosophila melanogaster</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Klebsiella planticola</i> , <i>Morganella morganii</i>
	Тирозиндекарбоксилаза (КФ 4.1.1.25)	<i>Petroselenium crispum</i>
	Декарбоксилаза ароматических аминокислот (ДОФА) (КФ 4.1.1.28)	человек, бык, свинья, крыса, морская свинка, <i>Caenorhabditis elegans</i> , <i>Drosophila melanogaster</i>
III	Орнитиндекарбоксилаза (КФ 4.1.1.17)	<i>E. coli</i>
	Лизиндекарбоксилаза (КФ 4.1.1.18)	<i>Hafnia alveri</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>E. coli</i>
	Аргининдекарбоксилаза (КФ 4.1.1.19)	<i>E. coli</i>
IV	Орнитиндекарбоксилаза (КФ 4.1.1.17)	человек, бык, крыса, хомяк, мышь, курица, <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Trypanosoma brucei</i> , <i>Leishmania donovani</i> , <i>Neurospora crassa</i> , <i>Xenopus laevis</i> , <i>Mus pahari</i>
	Аргининдекарбоксилаза (КФ 4.1.1.19)	<i>Avena sativa</i> , <i>E. coli</i> ,
	Диаминопимелатдекарбоксилаза (КФ 4.1.1.20)	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Corynebacterium glutamicum</i> , <i>E. coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Mycobacterium Tuberculosis</i>

рующим ферментом, определяющим равновесные уровни γ -аминомасляной кислоты в нервной системе позвоночных и беспозвоночных животных. С помощью моноклональных антител фермент был обнаружен в мозжечке, сетчатке глаза, спинном мозге [102]. Кроме того, физиологическая роль этого фермента связана с проблемами инсулин-зависимого диабета. В результате аутоиммунной деструкции β -клеток островков Лангерганса поджелудочной железы, продуцирующих инсулин, происходит образование аутоантител, которые появляются задолго до клинических проявлений заболевания и

обнаруживаются у больных в начальной стадии болезни. Глутаматдекарбоксилаза является основным аутоантигеном, связывающим антитела у больных этой формой диабета, это свойство используется для ранней диагностики заболевания [11, 28].

Выделение и получение гомогенной глутаматдекарбоксилазы из мозга животных было связано с преодолением ряда методических трудностей. Проведение операций на холоду в атмосфере газообразного азота, добавление аминоэтилтиоурониум-бромиды позволило получить препараты фермента из мозга человека, быка, крысы, мыши, а также из нервной ткани беспозвоночных животных — омара и дрозофилы [14]. Несмотря на небольшие количества выделенного фермента, были изучены некоторые его свойства: определена величина K_m , оптимум pH, аминокислотный состав, изучено влияние различных ионов на связывание субстрата в активном центре. Активность глутаматдекарбоксилазы, выделенной из мозга, ингибируется хлоридами и продуктом реакции — γ -аминомасляной кислотой [14].

Развитие современных генно-инженерных исследований позволило в несколько раз увеличить выход гомогенного фермента. В результате стало возможным снять спектры поглощения рекомбинантной глутаматдекарбоксилазы: были найдены два спектральных максимума при 420 нм и 338 нм; первый преобладает у каталитически активной формы, а второй — у инертной. Кроме того, удалось обнаружить спектральные изменения при добавлении субстрата [36]. Обнадёживающая перспектива для детального исследования глутаматдекарбоксилазы мозга открывается в связи с недавним появлением нового метода экспрессии гена, его применение позволило получать 400–500 мг фермента за один прием [37]. В последние годы из мозга или нервной ткани различных животных были выделены гомогенные препараты двух форм фермента — GAD65 и GAD67, которые различаются по молекулярной массе субъединицы — 65 кДа и 67 кДа; их первичная структура была определена [43]. Субъединица включает два участка: С-концевой — 500 аминокислотных остатков и N-концевой — 95–100 остатков. С-концевой участок содержит ПДФ-связывающий участок и весьма длинный сегмент, идентичный для GAD65 и GAD67. Гомология первичной структуры между двумя формами глутаматдекарбоксилазы для С-концевого участка составляет 73%, а для N-концевого — 23% [80].

Глутаматдекарбоксилаза обнаружена также и в других тканях животных — почках, семенниках и яичниках [98]. Третья форма фермента — GAD25, представляющая собой укороченный фрагмент GAD67, найдена в поджелудочной железе, семенниках и в коре надпочечников человека [34].

Из 60 исследованных растений наиболее богаты глутаматдекарбоксилазой тыква, авокадо и зеленый перец. Частично очищенные препараты фермента были получены из тыквы [74], редьки [39], барвинка [52] и ячменя [56]. Активность глутаматдекарбоксилазы в зернах злаковых растений резко увеличивается при изменении влажности среды, в которой хранится зерно; поэтому определение активности фермента используется в качестве чувствительного теста на начало прорастания зерна [51, 78, 101].

В последние годы были получены гомогенные препараты глутаматдекарбоксилазы из разных источников, и определена их аминокислотная последовательность. Полная первичная структура установлена для GAD67 и GAD65 из мозга человека, свиньи, крысы, мыши, GAD67 из мозга кошки и курицы, GAD65 из поджелудочной железы человека, фермента из мозга рыбы *Danio rerio*, а также нервной ткани дрозофилы и нематоды; частично расшифрована структура GAD67 и GAD65 из мозга зяблика, черепахи и рыбы *Goldfish*. Определена первичная структура глутаматдекарбоксилаз, выделенных из высших растений — томатов, петунии, табака, резуховитки (*Arabidopsis thaliana*), дрожжей, а также из некоторых бактерий — *Lactococcus lactis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Synechocystis sp.*, *Streptococcus pneumoniae*, *Aeropyrum pernix*, *Methanobacterium thermoautotrophicum* и *Escherichia coli* [26]. Среди упомянутых ферментов наиболее изученной является глутаматдекарбоксилаза из *E. coli*.

V. ГЛУТАМАТДЕКАРБОКСИЛАЗА ИЗ *E. COLI*

Начало современных исследований глутаматдекарбоксилазы из *E. coli* положено работами Шукуя и Шверта [88–90]. Эти авторы предложили метод выделения и очистки фермента из штамма *E. coli* 26, в результате был получен препарат 90% чистоты по данным электрофореза и ультрацентрифугирования. Установлены основные параметры фермента: молекулярная масса — 300 кДа, K_m — $8,2 \times 10^{-4}$ М, рН оптимум — 3,8. Фермент активен в интервале рН 3,0–5,0, активизируется ПЛФ и хлоридами, а ингибируется ацетатом [88]. Далее были исследованы спектральные свойства фермента. При рН 4,5, когда глутаматдекарбоксилаза находится в активной форме, ее спектр поглощения имеет максимум при 415 нм. При значениях рН > 6,5, когда фермент переходит в неактивную форму, его спектр поглощения имеет максимум при 340 нм. Добавление глутамата к активной форме фермента, приводит к уменьшению поглощения при 415 нм и увеличению поглощения при 330 нм, причем эти изменения являются обратимыми. Аналогичные изменения свойств фермента в зависимости от рН и

добавления субстрата были найдены при изучении спектров флуоресценции [89]. Затем было показано, что фермент инактивируется в разбавленных растворах на холоду. Холодовая инактивация была вызвана изменением конформации фермента, что подтверждалось увеличением числа титруемых SH-групп. Добавление ПЛФ и сывороточного альбумина, а также увеличение ионной силы раствора предотвращало инактивацию фермента [90].

СТРУКТУРА

Штраусбах и Фишер определили аминокислотный состав и концевые аминокислоты глутаматдекарбоксилазы [92]; N-концевой аминокислотой является частично ацилированный метионин, а C-концевой — треонин. Далее было показано, что ПЛФ связан с ϵ -аминогруппой лизина белка [24], и нонапептид, содержащий пиридоксил-лизин, был выделен из триптического гидролизата фермента [7, 93]. Первичная структура фермента была установлена на основе изучения его аминокислотной последовательности и дополнена секвенированием фрагмента гена, субъединица состоит из 466 аминокислотных остатков [69]. Впоследствии было обнаружено существование двух генов глутаматдекарбоксилазы в геноме *E. coli* — *gadA* и *gadB*, расположенных соответственно на 33 мин и 77 мин генетической карты; нуклеотидная последовательность этих генов совпадает на 98% [91]. Далее были выделены изозимы рекомбинантной глутаматдекарбоксилазы — $GAD\alpha$ и $GAD\beta$ [19, 38]. Из сравнения аминокислотных последовательностей этих изозимов видно, что все отличия в их составе находятся в N-концевом участке субъединицы фермента (рис. 5).

Глутаматдекарбоксилаза существует в двух формах: каталитически активной и инертной. Каталитически активная форма окрашена в зеленовато-желтый цвет, присущий пиридоксальевым ферментам; она имеет спектральный максимум с положительной величиной КД при 420 нм, характерный для протонированного альдимины, образованного ϵ -аминогруппой лизина и альдегидной группой ПЛФ. Инертная форма фермента бесцветна, она имеет максимум поглощения при 340 нм, причем величина КД этого максимума более чем на порядок ниже, чем у каталитически активной декарбоксилазы при 420 нм. В этом случае кофермент присоединяется к лизину по типу замещенного альдамина [6, 53, 94]. Глутаматдекарбоксилаза представляет собой гексамер с молекулярной массой — 300 кДа и константой седиментации $s_{20,w}^{\circ} = 12,8S$. Макромолекула состоит из шести идентичных субъединиц, на каждую приходится по одному остатку ПЛФ. По данным электронной микроскопии субъединицы упакованы в два слоя, каждый из которых состоит из трех субъединиц, расположенных

1.	MDQKLLTDFR MDKKQVTDLR	SELLDSRFGA SELLDSRFGA	KAI ^A ISTIAESK KSI ^S ISTIAESK	RFPLHEMRDD RFPLHEMRDD	VAFQIINDEL VAFQIINDEL	YLDGNARQNL YLDGNARQNL
61.	ATFCQTWDDE ATFCQTWDDE	NVHKLMDLSI NVHKLMDLSI	NKNWIDKEEY NKNWIDKEEY	PQSAAILLRC PQSAAILLRC	VNMVADLWHA VNMVADLWHA	PAPKNGQAVG PAPKNGQAVG
121.	TNTIGSSEAC TNTIGSSEAC	MLGGMAMKWR MLGGMAMKWR	WRKRMEAAAGK WRKRMEAAAGK	PTDKPNLVCG PTDKPNLVCG	PVQICWHKFA PVQICWHKFA	RYWDVELREI RYWDVELREI
181.	PMRPGQLFMD PMRPGQLFMD	PKRMIEACDE PKRMIEACDE	NTIGVVPTFG NTIGVVPTFG	VTYTGNYEFP VTYTGNYEFP	QPLHDALDKF QPLHDALDKF	QADTGIDIDM QADTGIDIDM
241.	HIDAASGGFL HIDAASGGFL	APFVAPDIVW APFVAPDIVW	DFRLPRVКСI DFRLPRVКСI	SASGH(K)FGLA SASGH(K)FGLA	PLGCGWVIWR PLGCGWVIWR	DEEALPQELV DEEALPQELV
301.	FNVGYLGGQI FNVGYLGGQI	GTFAINFSRP GTFAINFSRP	AGQVIAQYVE AGQVIAQYVE	FLRLGREGYT FLRLGREGYT	KVQNASYQVA KVQNASYQVA	AYLADEIAKL AYLADEIAKL
361.	GPYEFICTGR GPYEFICTGR	PDEGIPAVCF PDEGIPAVCF	KLKDGEDPGY KLKDGEDPGY	TLYDLSERLR TLYDLSERLR	LRGWQVPAFT LRGWQVPAFT	LGGEATDIVV LGGEATDIVV
421.	MRIMCRRRGFE MRIMCRRRGFE	MDFAELLLED MDFAELLLED	YKASLKYLSLSD YKASLKYLSLSD	HPKLQGIQQQ HPKLQGIQQQ	NSFKHT NSFKHT	

Рис. 5. Аминокислотная последовательность изоэтомов GAD α (верхний ряд) и GAD β (нижний ряд) [38].

Выделены аминокислотные остатки, которые различаются у изоэтомов.

В скобках лизин, связанный с ПДФ.

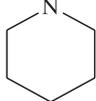
под углом 120° ; слои наложены друг на друга со смещением 60° [99]. В разбавленных растворах фермента (20–40 мкг/мл) при 4°C , а также при смещении рН раствора аподекарбоксилазы до 6,0, т.е. в мягких условиях, происходит диссоциация исходного гексамера на неактивные димеры (константа седиментации $s_{20,w}^\circ = 5,5\text{S}$) [16, 97]. Равновесие в системе гексамер-димеры зависит от концентрации белка и кофермента, рН среды и присутствия гидрофильных соединений [16]. Образование димеров происходит в очень узком интервале рН, всего 0,5 единицы. В этом же интервале изменяются оптические свойства и ферментативная активность холодекарбоксилазы [18]. При добавлении ПЛФ к димерам аподекарбоксилазы восстанавливается гексамерная структура, активность и оптические свойства, присущие холодекарбоксилазе [5]. В жестких условиях при добавлении гуанидин-хлорида или DSNa к ферменту происходит его полная диссоциация до мономеров [92].

МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ

Реакция фермента с аналогами субстрата

Результаты исследований по взаимодействию глутаматдекарбоксилазы с аналогами субстрата показали, что ферменту свойственна высокая специфичность как при связывании аналогов субстрата, так и при их каталитическом превращении. Связывание монокарбоновых и дикарбоновых кислот бактериальной глутаматдекарбоксилазой детально изучено в работах Фонды [45, 46]. Ею установлено, что сродство этих соединений к ферменту зависит от длины их углеродной цепи; среди дикарбоновых кислот наибольшим ингибирующим эффектом обладала глутаровая кислота, а среди монокарбоновых — валериановая кислота. На основании этих данных было высказано предположение, что и субстрат, глутаминовая кислота, связывается с ферментом, находясь в растянутой конформации углеродной цепи длиной в 6 \AA и в форме моноаниона. Глутаматдекарбоксилаза может осуществлять каталитическое превращение ряда аминокислот — аналогов глутаминовой кислоты (табл. 3). γ -Метиленглутаминовая, γ -фторглутаминовая и β -оксиглутаминовая кислоты трансформируются с высокой скоростью. Обнаруженное в ходе экспериментов декарбоксилирование γ -метиленглутаминовой, β -оксиглутаминовой, гомоцистеиновой, аминокадипиновой, цистеинсульфиновой и аспарагиновой кислот может иметь место и в физиологических условиях. Особенно следует отметить роль фермента в обмене аспарагиновой кислоты, широко распространенной в различных организмах [14]. Следующие особенности характерны для субстратной специфичности глутаматдекарбоксилазы из *E. coli*:

окончание табл. 3

1	2	3	4	5	6
2-Метилглутаминовая	$\text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\overset{\text{CH}_3}{\underset{\text{NH}_2}{\text{C}}}-\text{COOH}$	0,13	(6,6)	0,52	100
4-Пиперидино-глутаминовая	$\text{HOOC}-\underset{\text{N} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array}}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$ 	0,11	(11,2)	—	—
Цистеинсульфиновая	$\text{HOOS}-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$	0,06	—	6,2	50
4-Бутиламино-глутаминовая	$\text{HOOC}-\underset{\text{NH} \begin{array}{c} \\ \text{C}_4\text{H}_9 \end{array}}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$	0,06	—	17	—
Аспарагиновая	$\text{HOOC}-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$	0,06	(11,5)	2,5	80
3-Фосфоаланин	$\begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{O}=\text{P}-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH} \\ \\ \text{OH} \end{array}$	—	—	3,8	7**
4-Фосфо-2-аминомасляная	$\begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{O}=\text{P}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH} \\ \\ \text{OH} \end{array}$	—	—	4,6	3**
3-Арсоаланин	$\begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{O}=\text{As}-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH} \\ \\ \text{OH} \end{array}$	—	—	3	2,5**
4-Арсо-2-аминомасляная	$\begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{O}=\text{As}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH} \\ \\ \text{OH} \end{array}$	—	—	46	1**

* — 1×10^{-3} М субстрата добавлено после преинкубации фермента с 1×10^{-2} М аналога в течение часа;

** — реакцию декарбоксилирования измеряли по образованию амина.

1. D-глутаминовая кислота неактивна.
 2. Продукт реакции — γ -аминомасляная кислота — даже в большой концентрации не влияет ни на активность, ни на спектральные свойства фермента.
 3. Для осуществления ферментативной реакции оптимальна длина углеродной цепи адекватного субстрата. Удлинение углеродной цепи (в аминокислоте) или ее укорочение (в аспарагиновой кислоте) даже на одно метиленовое звено резко снижает скорость реакции.
 4. Для реакции с ферментом аминокислота должна иметь дистальный карбоксил, при замене его на сульфоновую, фосфоновую или арсоновую группу скорость реакции резко снижается [17, 61].
 5. Глутаматдекарбоксилаза предъявляет строгие стерические требования к строению субстрата: резкое снижение активности наблюдается при замене атома водорода в α - или β -положении глутаминовой кислоты на метильную группу.
 6. Наибольшая возможность для реакции с ферментом сохраняется при модификации аминокислоты по γ -углеродному атому. В этом случае некоторые аминокислоты по скорости декарбоксилирования приближаются к субстрату. Кроме того, свойства субстратов проявляют даже γ -замещенные аналоги с объемными заместителями [14].
- Таким образом, фермент предъявляет весьма строгие требования к структуре субстрата.

Для характеристики сродства различных аналогов к ферменту были определены величины K_m , K_i и I_{50} . Сродство изученных аминокислот к глутаматдекарбоксилазе варьирует значительно меньше, чем скорость реакции: кроме крайних значений K_m , свойственных глутаминовой и гомоцистеиновой кислотам, все полученные величины отличаются в 2–3 раза, в то время как скорость реакции различается на несколько порядков. Величину K_i удалось установить лишь для некоторых аминокислот, при этом было доказано, что они являются конкурентными ингибиторами. В большинстве случаев для оценки ингибиторных свойств этих соединений была использована величина I_{50} , она оказалась наименьшей для α -метилглутаминовой кислоты, а наибольшей — для 4-арсоно-2-аминомасляной, разница между ними составляет два порядка. Большинство малоактивных аналогов обладает и низким сродством к ферменту. Исключением является α -метилглутаминовая кислота, которая имеет значительную величину сродства, но превращается медленно (см. табл. 3).

Реакция побочного трансаминирования кофермента

Калянкер и Снелл [60] обнаружили, что в модельной системе при неферментативном декарбоксилировании алкилзамещенных аминокислот кроме основной реакции происходит и побочная — трансаминирование пиридоксаля. В дальнейшем были выделены и описаны ферменты из почвенных бактерий — аминотрансферазы α -алкилзамещенных аминокислот, которые осуществляют аналогичные превращения [20, 29]. Затем Новгородский и Майстер [79] в экспериментах с аспаратат β -декарбоксилазой показали, что декарбоксилирование субстрата сопровождается трансаминированием кофермента и предположили, что эта реакция является общей для пиридоксальных ферментов и контролирует их активность. При взаимодействии глутаматдекарбоксилазы из *E. coli* с α -метилглутаминовой кислотой было обнаружено уменьшение величины поглощения при 420 нм и появление недихроичного спектрального максимума при 330 нм. Спектральные изменения сопровождались инактивацией фермента, добавление ПЛФ приводило к восстановлению активности [94]. Эти данные были подтверждены и далее было доказано, что под действием глутаматдекарбоксилазы α -метилглутаминовая кислота медленно декарбоксилируется. Среди продуктов реакции помимо γ -аминовалериановой кислоты и углекислого газа были обнаружены 4-кетопентановая (левулиновая) кислота и пиридоксаминфосфат. Таким образом, кроме основной реакции — декарбоксилирования аминокислоты — происходит и побочная реакция — трансаминирование кофермента. Образующийся ПМФ слабо связан с белком и легко отщепляется с образованием апофермента. [54]. Можно было предположить, что побочное трансаминирование в данном случае обусловлено отсутствием в α -метилглутаминовой кислоте водорода при C_{α} -атоме. Поэтому надо было показать трансаминирование ПЛФ при реакции фермента с другими аминокислотами и, прежде всего, с субстратом. Сухарева и Браунштейн [12] в опытах с аспарагиновой кислотой — соединением, где водород при C_{α} -атоме не замещен, показали, что инактивация фермента после окончания реакции сопровождалась появлением недихроичного спектрального максимума при 330 нм. Из реакционной среды был выделен и идентифицирован ПМФ, следовательно произошло побочное трансаминирование кофермента. Однако нельзя было исключить, что эта реакция обусловлена изменением конформации активного центра, вызванным аналогом, отличающимся по строению от нормального субстрата. В опытах с субстратом — глутаминовой кислотой — реакция постепенно прекращалась вследствие инактивации фермента, добавление ПЛФ реактивировало декарбоксилазу. ПМФ был выделен и идентифици-

рован также и при декарбоксилировании глутаминовой кислоты, следовательно, побочная реакция — трансаминирование кофермента — происходит и в опытах с субстратом. Побочное трансаминирование кофермента обнаружено при декарбоксилировании всех аминокислот — аналогов субстрата. В опытах с быстро реагирующими аминокислотами существование побочной реакции доказывали по реактивации фермента при добавлении ПЛФ после прекращения основной реакции, т.е. так же, как в опытах с адекватным субстратом. В опытах с медленно реагирующими аналогами признаком трансаминирования можно считать появление недихроичного спектрального максимума при 330 нм, подобно тому, что наблюдали в опытах с α -метилглутаминовой кислотой [13]. Соотношение между основной и побочной реакцией варьирует от 300 000 в опытах с адекватным субстратом — глутаматом до 1–3 в опытах с 3-арсоноаланином, 4-арсоно-2-аминобутиратом и 4-фосфоно-2-аминобутиратом; в последних случаях фермент проявляет себя практически одинаково как декарбоксилаза и как трансминаза (см. табл. 3). Расположение протонов у С-4' атома ПМФ, образованного при побочном трансаминировании в результате декарбоксилирования и при обычном трансаминировании, одинаково, т.е. протон в ходе реакции присоединяется к формильному углероду кофермента с доступной «si» стороны и имеет конфигурацию pro S [95].

Последовательность стадий ферментативного декарбоксилирования

Последовательность стадий ферментативного декарбоксилирования глутаминовой кислоты была постулирована уже в ранних работах. Сначала образуется альдимин с субстратом, далее отщепляется карбоксильная группа аминокислоты с образованием хиноидного производного, затем следует появление комплекса фермента с продуктом реакции и гидролиз этого комплекса с освобождением продукта и неизмененного кофермента, связанного с белком [68].

Модель реакции ферментативного декарбоксилирования глутаминовой кислоты была предложена Морозовым и др. [22, 23] на основании сопоставления данных спектрокинетических экспериментов с результатами квантово-химических расчетов. Спектрокинетический подход дал возможность исследовать изменения спектров поглощения во времени, отражающие взаимодействие фермента с субстратом. Данные экспериментов подтвердили, что начальный дифференциальный спектр является суперпозицией полос поглощения равновесной динамической смеси промежуточных продуктов. Измеренные во времени дифференциальные спектры пог-

лощения комплекса глутаматдекарбоксилазы с глутаминовой кислотой были разложены на четыре полосы с максимумами при 445–450 нм, 420 нм (отрицательный КД), 365 нм и 335 нм. Сопоставление этих данных с результатами квантово-химических расчетов позволило установить природу промежуточных продуктов, ответственных за эти полосы поглощения.

I. $\lambda_{\max} = 420$ нм (положительный КД) — исходный фермент, внутренний альдимин ПЛФ с ϵ -аминогруппой лизина.

II. $\lambda_{\max} = 335$ нм — тетраэдрический комплекс фермента с субстратом и лизином.

III. $\lambda_{\max} = 420$ нм (отрицательный КД) — внешний альдимин ПЛФ с протонированным иминным азотом.

IIIa. $\lambda_{\max} = 365$ нм — внешний альдимин ПЛФ с депротонированным иминным азотом.

IV. $\lambda_{\max} = 445$ -450 нм — кофермент-субстратный карбанион (биполярная форма).

V. $\lambda_{\max} = 345$ нм — кофермент-субстратный карбанион (нейтральная форма).

Таким образом, на основании результатов экспериментов и расчетов была предложена схема реакции ферментативного декарбоксилирования, представленная на рис. 6.

Реакция начинается с того, что молекула субстрата атакует внутренний альдимин ПЛФ с ϵ -аминогруппой лизина (I) через промежуточный тетраэдрический комплекс (II), это приводит к образованию внешнего альдимина ПЛФ с субстратом (III). Внешний альдимин присутствует в основном в виде ионной формы III, но возможно также и появление незначительных количеств формы IIIa с депротонированным альдиминным азотом. Отщепление от структуры III карбоксильной группы приводит к образованию хиноидных структур IV и V, которые являются прототропными таутомерами. В этих соединениях атомы C-4' и C $_{\alpha}$ имеют заметный отрицательный заряд. Большие π -электронные заряды, локализованные на этих атомах, делают их свойства подобными свойствам атомов с неподеленной электронной парой. Отмеченные особенности электронной структуры соединений IV и V определяют, какой из этих атомов будет атакован протоном. Для нормального протекания реакции декарбоксилирования необходима атака протоном C $_{\alpha}$ -атома в структуре IV. По мере приближения к IV единичного положительного заряда, равноудаленного от атомов C $_{\alpha}$ и C-4', происходит возрастание отрицательных зарядов на этих атомах, причем величина заряда на C $_{\alpha}$ -атоме значительно превосходит величину заряда на C-4'-атоме [23]. При дальнейшем протекании ферментативной реакции образуется внешний альдимин ПЛФ с

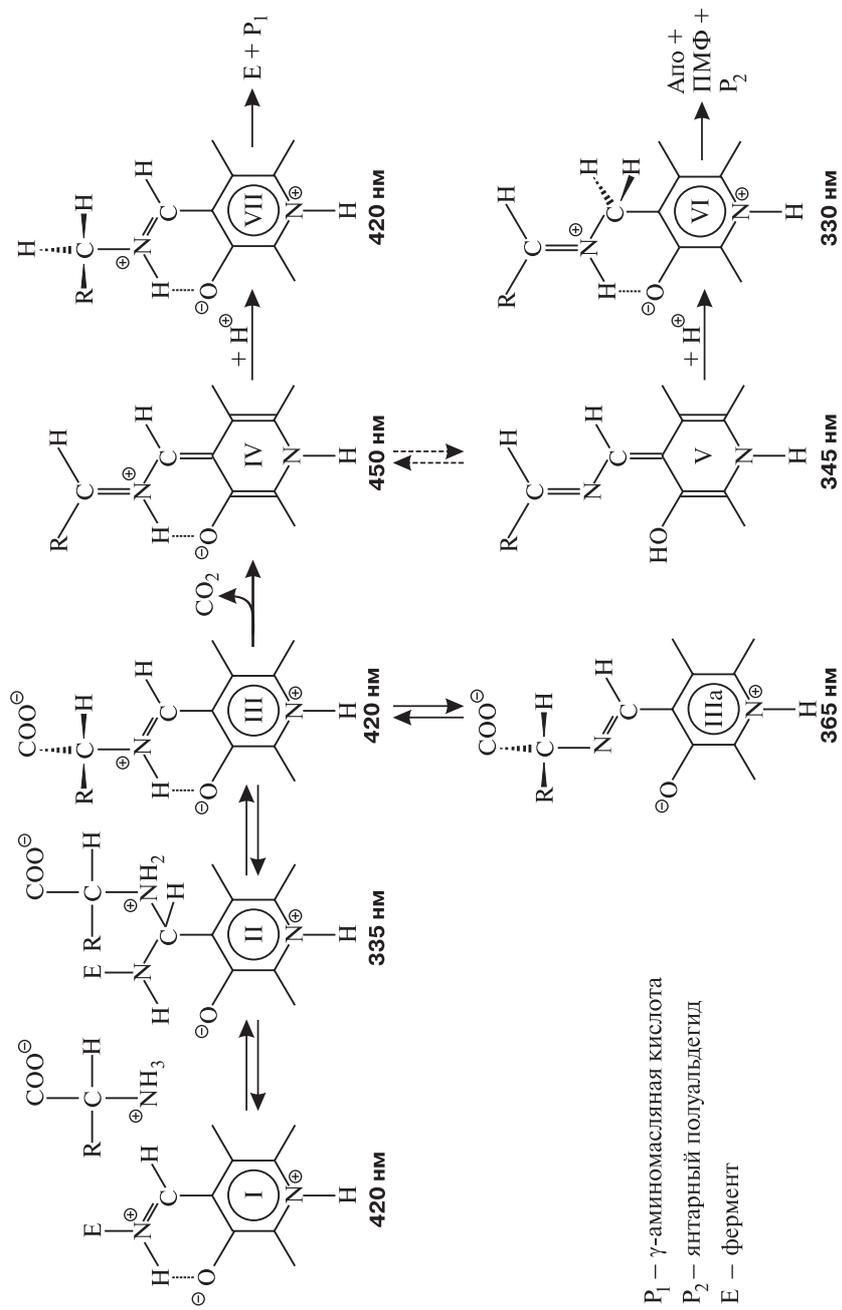


Рис. 6. Модельная схема ферментативного декарбоксилирования глутаминовой кислоты [96].

γ -аминомасляной кислотой (VII) и далее после гидролиза — снова внутренний альдимин ПЛФ с лизином и продукт реакции γ -аминомасляная кислота. Что касается структуры V, то отрицательный заряд на атоме C-4' заметно превосходит заряд на атоме C _{α} , в связи с этим будет реализовываться атака протоном атома C-4', что может привести к побочному трансаминированию. В этом случае образуется кетимин (VI), который затем в результате гидролиза превращается в ПМФ и янтарный полуальдегид. Таким образом, анализ электронной структуры позволяет предсказать место наиболее вероятной атаки протоном, причем это теоретическое предсказание полностью согласуется с результатами эксперимента [1, 10, 22, 23, 96].

Необратимые ингибиторы

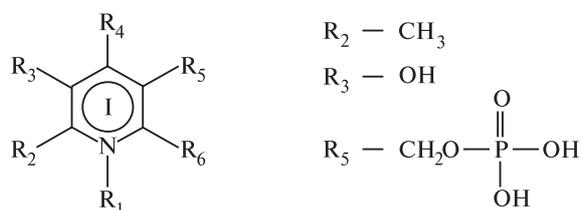
В экспериментах по изучению механизма действия ПЛФ-ферментов достаточно продуктивным является использование необратимых ингибиторов, фиксирующих определенные стадии реакции. Ряд таких исследований был проведен и с бактериальной глутаматдекарбоксилазой. Четыре изомера циклических производных глутаминовой кислоты: *трео*- α -циклоглутамат, *эритро*- α -циклоглутамат, *эритро*- γ -циклоглутамат и *трео*- γ -циклоглутамат были исследованы в работе Сашенко и др. [85]. Было установлено, что сродство *эритро*-производных к ферменту значительно превышает сродство *трео*-циклоглутаматов. При реакции глутаматдекарбоксилазы с *эритро*- γ -циклоглутаматом наблюдалось медленное уменьшение величины поглощения и КД при 420 нм и появление недихроичного пика с максимумом при 380 нм. Вначале связывание ингибитора было обратимым, но при дальнейшей инкубации во времени оно становилось необратимым, что связано с раскрытием цикла и образованием *эритро*- β -аминооксиглутамата. Другим необратимым ингибитором оказалась 4-аминогекс-5-иноевая кислота, изученная Янгом и др. [59]. Реакция с этим соединением останавливается после образования внешнего альдимида до декарбоксилирования. Добавленный ПЛФ не реактивирует фермент. По-видимому, связывание образовавшегося альдимида в активном центре фермента осуществляется за счет тройной связи 4-аминогекс-5-иноевой кислоты. Коллонитш и др. [62] предложили методы введения галогенов в α -метильную группу аминокислот и использовали полученные соединения для исследования ПЛФ-зависимых декарбоксилаз аминокислот. При этом наблюдалось резкое изменение характера взаимодействия аналога с ферментом. В дальнейшем Куо и Рандо [63] установили, что α -фторметилглутаминовая кислота является необратимым ингибитором

глутаматдекарбоксилазы с высоким сродством к ферменту. Была предложена схема механизма инактивации фермента α -фторметил-глутаминовой кислотой, согласно которой после декарбоксилирования происходит элиминирование фтора и образование альдимины с остатком аминокислоты. Исследования, проведенные с α -хлор-фторметилзамещенными аминокислотами, необратимо инактивирующими декарбоксилазы аминокислот, показали, что эти соединения имеют высокую степень сродства к глутаматдекарбоксилазе [87]. Наиболее вероятно, что при взаимодействии с ферментом они образуют альдимины с ПЛФ, декарбоксилируются, а после элиминирования галоида необратимо связываются с ферментом.

Метцлер с сотр. [64–66] исследовали механизм реакции глутаматдекарбоксилазы с еще одним необратимым ингибитором фермента — L-серин *O*-сульфатом. Оказалось, что серин *O*-сульфат инактивирует фермент, при этом появляется недихроичный спектральный максимум при 335 нм, причем добавление ПЛФ не реактивирует фермент. Для ускорения этой реакции, помимо глутаматдекарбоксилазы, необходим другой белок с молекулярной массой около 30 кДа. Реакция приводит к элиминированию SO_4^{2-} -группы серин *O*-сульфата с образованием аммиака, пировиноградной кислоты и неорганического сульфата. Кроме того, образуется фермент-ингибиторный комплекс. В процессе дальнейшей обработки этого комплекса и отделения апофермента был получен так называемый продукт Шнеккерца — 2-оксо-3-фосфопиридоксиденпропионовая кислота. Было высказано предположение, что по тому же пути протекает реакция с 3-хлораланином. Гани исследовал механизм и стереохимические аспекты реакции ингибирования глутаматдекарбоксилазы L- и D-серин *O*-сульфатом [81, 82]. Эксперименты, проведенные с L-серин *O*-сульфатом, подтвердили данные полученные Метцлером: реакция не сопровождалась декарбоксилированием, несмотря на то, что карбоксильная группа находилась в оптимальной позиции для ее отщепления, а именно, на характерной для всех L-аминокислот 4'-«*si*»-стороне кофермента. С другой стороны, оказалось, что при взаимодействии глутаматдекарбоксилазы с D-серин *O*-сульфатом происходят реакции декарбоксилирования и элиминирования. Оба процесса осуществляются на 4'-«*re*»-стороне кофермента, противоположной той, которая используется при физиологической реакции декарбоксилирования, то есть 4'-«*si*»-стороне. Таким образом, был показан различный характер взаимодействия энантиомеров серин *O*-сульфата с глутаматдекарбоксилазой и образование двух различных фермент-субстратных комплексов.

Реакция апофермента с аналогами ПЛФ

Весьма строгими оказались требования глутаматдекарбоксилазы к структуре кофермента. Была исследована способность аналогов ПЛФ, замещенных по разным положениям, связываться с аподекарбоксилазой и реактивировать ее и образовывать гексамер фермента из неактивных димеров. В формуле ПЛФ указаны положения 1–6, роль каждого из них обсуждается ниже.



R_1 — модификация азота пиридинового кольца не препятствует его способности присоединять протон. Апоглутаматдекарбоксилаза с N-оксидом ПЛФ образует комплекс, активность которого составляет 29 % от активности природного фермента.

R_2 — 2-метильная группа кофермента не принимает участия в образовании и трансформации связей энзим-субстратных комплексов. 2-нор-ПЛФ образует с апоферментом комплекс, его активность составляет 20 % от активности природного фермента. Кроме того, этот аналог способен осуществлять сборку макромолекулы фермента из неактивных димеров.

R_3 — 3-окси группа важна как для связывания кофермента, так и для каталитического превращения глутаминовой кислоты.

R_4 — карбонильная группа играет основную роль в образовании альдиминной связи, но не обязательна для ассоциации неактивных димеров в гексамер. Модификация этой группы полностью исключает возможность осуществления ферментативной реакции, сохраняя способность аналога связываться в коферментном участке активного центра. При связывании наибольшее сродство к апоферменту проявляет пиридоксинфосфат, наименьшее — ПМФ.

R_5 — неизменный фосфатный остаток ПЛФ в форме дианиона необходим для проявления ферментативной активности декарбоксилазы. Длина цепи и стерические свойства аналога существенно ограничивают эти возможности. Неизменный фосфатный остаток также необходим для формирования макромолекулы фермента. В то же время связывание аналогов ПЛФ (без их участия в каталитическом превращении) может происходить при изменении длины цепи,

стерической конфигурации а также замене фосфатного остатка на фосфонатную, сульфатную или карбоксильную группу.

R₆ — метилированный ПЛФ аналог может образовать альдиминную связь, но активность полученного комплекса крайне мала. [6, 8, 44, 72].

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ГРУППЫ

Лизин (K²⁷⁶) связывает альдегидную группу ПЛФ, это единственный аминокислотный остаток в молекуле фермента, чья роль и локализация точно определены [7, 69, 93].

Гистидин участвует в каталитическом превращении субстрата. При действии диэтилпирокарбоната на глутаматдекарбоксилазу удалось выявить один остаток гистидина, модификация которого приводит к инактивации фермента и равномерному снижению оптической плотности при 340 нм, 365 нм и 420 нм. Поскольку эти спектральные изменения отражают различные стадии ферментативной реакции, то можно полагать, что гистидин принимает участие в осуществлении уже первой стадии образования кофермент-субстратного комплекса — нуклеофильной атаки С-4' атома кофермента аминокислотной группой субстрата [9]. Два остатка гистидина — Н¹⁶⁷ и Н²⁷⁵ — были заменены методом направленного мутагенеза на аспарагин и глутамин. Исследование спектральных и кинетических свойств полученных мутантов показало, что Н²⁷⁵ участвует в связывании ПЛФ, а Н¹⁶⁷ связан с конформационными изменениями образующегося кофермент-субстратного комплекса [100].

Аргинин участвует в связывании фосфатной группы ПЛФ, что доказано путем модификации аподекарбоксилазы фенилглиоксалем с последующим выделением модифицированного аргинина из продуктов кислотного гидролиза. Аподекарбоксилаза с модифицированным остатком аргинина не способна образовать холофермент [35]. Другой остаток аргинина, который модифицировали 2,3-бутандионом в кислой среде, участвует в связывании дистальной карбоксильной группы субстрата [4].

Цистеин располагается в ПЛФ-связывающем участке активного центра. Модификация этого остатка у аподекарбоксилазы бромпируватом препятствует образованию холофермента [47]. Нативный гексамер холофермента и апофермента не содержит свободных сульфгидрильных групп, при денатурации DSNa, т.е. образовании мономера десять остатков цистеина на субъединицу становятся доступными. Димер апофермента содержит восемь доступных остатков цистеина и два скрытых. По мере добавления ПЛФ к димерам и образования гексамера происходит полное экранирование остатков цистеина [5].

КОМПЬЮТЕРНО–ГРАФИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Предварительные рентгеноструктурные исследования глутаматдекарбоксилазы из *E. coli* были проведены с препаратами природного и рекомбинантного фермента. Были получены кристаллы комплекса природного фермента с глутаратом, определена их пространственная группа и параметры элементарной ячейки [15, 70]. Ячейка содержала димер [70] и гексамер [15] на асимметрическую единицу. Дальнейшие рентгеноструктурные исследования были проведены с рекомбинантным β -изоформом глутаматдекарбоксилазы. Были получены кристаллы комплекса апофермента с фосфопиридоксилглутаминовой кислотой, определена пространственная группа и параметры элементарной ячейки, которая содержит гексамер на асимметрическую единицу [67].

Поскольку пока проведены лишь предварительные рентгеноструктурные исследования [15, 67, 70], и пространственная структура глутаматдекарбоксилазы не установлена, то представляет интерес возможность построения структуры активного центра фермента с помощью компьютерного моделирования. Аминокислотная последовательность GAD α из *E. coli* была сопоставлена с последовательностью 36 других известных глутаматдекарбоксилаз методом парного выравнивания. Гомология в структуре субъединицы между изоформом GAD α и другими бактериальными глутаматдекарбоксилазами составляла 49,8–77,6%; GAD α и растительными ферментами — 59,8–67,8%; GAD α и ферментами животного происхождения — 13,9–58,8%. Кроме того, была сопоставлена аминокислотная последовательность глутаматдекарбоксилаз и ПЛФ — ферментов с известной пространственной структурой, в качестве которых были использованы аспаратаминотрансфераза из митохондрий сердца кур (mAAT) и орнитиндекарбоксилаза из *Lactobacillus 30a* (ORD Lac.). Это позволило установить ПЛФ-связывающие домены у глутаматдекарбоксилаз. Степень гомологии для доменов GAD α и ферментов бактериального, растительного происхождения а также GAD67 из мозга животных была выше, чем для субъединицы. Первичная структура ПЛФ — доменов у бактериальных и растительных ферментов весьма сходна и отличается от глутаматдекарбоксилаз, выделенных из тканей животных [26]. Это объясняет ранее отмеченное различие в их свойствах [14, 31].

Сопоставление аминокислотной последовательности GAD α и других ферментов позволило выделить консервативные остатки в структуре субъединицы и активного центра молекулы. Представляло интерес выявление консервативных остатков GAD α и GAD67 из мозга человека. В кофермент-связывающем участке активного центра

эти остатки аминокислот выявлены весьма четко: они или совсем одинаковы (лизин, аспарагиновая кислота, гистидины) или сходны по строению (табл. 4). В субстрат-связывающем участке активного центра одинаковы последовательности из трех остатков (ERL), содержащих аргинин, реагирующий с α -карбоксильной группой глутаминовой кислоты. Менее определенная картина складывается для аргинина, реагирующего с γ -карбоксильной группой. Следует отметить, что присутствие гидрофобных остатков возле аргинина у GAD α хорошо согласуется с ранее установленной для него необычно низкой величиной рК [4], (табл. 5). Таким образом, выявлено сходство в структуре активного центра GAD α и GAD67, несмотря на то, что гомология в строении субъединицы у этих ферментов весьма невелика [26].

Таблица 4
Консервативные участки в ПЛФ-связывающем
участке активного центра [26]

Фермент	Взаимодействие с фосфатной группой			Донор протона	Солевой мостик с N	Донор протона	Шиффово основание с ПЛФ
ODC Lac	S ¹⁹⁸	S ¹⁹⁹	A ²²¹	H ²²⁴	D ³¹⁶	H ³⁵⁴	K ³³⁵
GAD 67 человека	G ²⁵²	A ²⁵³	S ²⁵⁵	H ²⁹¹	D ³⁷³	H ⁴⁰⁴	K ⁴⁰⁵
GAD α <i>E. Coli</i>	S ¹²⁶	S ¹²⁷	G ¹²⁹	H ¹⁶⁷	D ²⁴³	H ²⁷⁵	K ²⁷⁶

Таблица 5
Консервативные участки в
субстрат-связывающем участке активного центра [26]

Фермент	Связывание α -карбоксила			Связывание γ -карбоксила				
m AAT	E ³⁸⁵	R ³⁸⁶	L ³⁸⁷	L ²⁹⁰	I ²⁹¹	R ²⁹²	P ²⁹³	M ³³⁵
GAD 67 человека	E ⁵⁸⁹	R ⁵⁹⁰	L ⁵⁹¹	C ⁴⁵⁷	G ⁴⁵⁸	R ⁴⁵⁸	H ⁴⁶⁰	V ⁴⁶¹
GAD α <i>E. Coli</i>	E ³⁹⁷	R ³⁹⁸	L ³³¹	F ³³²	L ³³²	R ³³³	L ³³⁴	G ³³⁵

VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Суммируя имеющийся материал по исследованию структуры и каталитических свойств глутаматдекарбоксилазы, можно заключить, что мы располагаем набором необходимых данных в рамках классической энзимологии. К ним относятся сведения о макромолекулярной структуре фермента, последовательности аминокислот в полипептидной цепи, предложенная схема последовательных стадий ферментативного декарбоксилирования, данные о субстратных и ингибиторных свойствах аналогов субстрата и необратимо связывающихся ингибиторов. Вместе с тем обозначен переход и к более современным методам исследования — рентгеноструктурному анализу кристаллов фермента и направленному мутагенезу, что составит задачу дальнейших исследований.

Сходство в структуре активного центра глутаматдекарбоксилазы из *E. coli* и GAD67 из мозга человека позволяет надеяться, что экспериментальный материал, полученный для бактериального фермента, может быть использован и для понимания механизма действия глутаматдекарбоксилаз, столь важных для физиологии и медицины.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант N 99-04-48901)

ЛИТЕРАТУРА:

1. Алмазов В.П., Морозов Ю.В., Савин Ф.А., Сухарева Б.С. // Мол. биол. 1985. Т. 19. С. 359—370.
2. Браунштейн А.Е., Шемякин М.М. // Докл. АН СССР. 1952. Т. 85, С. 1115—1118.
3. Браунштейн А.Е., Шемякин М.М. // Биохимия. 1953. Т. 18. С. 393—411.
4. Воспельникова Н.Д., Дарий Е.Л., Сухарева Б.С. // Биоорганическая химия. 1983. Т. 9. С. 1026—1031.
5. Дарий Е.Л., Сухарева Б.С. // Биохимия. 1992. Т. 57. С. 574—581.
6. Куликова А.И., Сухарева Б.С., Львова С.Д., Степанова С.В., Гунар В.И. // Мол. биол. 1982. Т. 16. С. 585—592.
7. Механик М.Л., Торчинский Ю.М. // Биохимия. 1970. Т. 35. С. 504—509.
8. Механик М.Л., Флорентьев В.Л., Торчинский Ю.М. // Мол. биол. 1972. Т. 6. С. 586—596.
9. Мишин А.А., Сухарева Б.С. // Докл. АН СССР. 1986. Т. 290. С. 1268—1271.
10. Морозов Ю.В., Алмазов В.П., Савин Ф.А., Сухарева Б.С. Физико-химические проблемы ферментативного катализа. / Ред. Торчинский Ю.М. Москва: Наука. 1984. С. 210—217.
11. Панков Ю.А. // Вопр. мед. химии. 1997. Т. 43. С. 349—354.
12. Сухарева Б.С., Браунштейн А.Е. // Мол. биол. 1971. Т. 5. С. 302—317.
13. Сухарева Б.С., Маликова Л.Г. // Мол. биол. 1977. Т. 11. С. 394—402.
14. Сухарева Б.С. Физико-химические проблемы ферментативного катализа

- // Ред. Торчинский Ю.М. Москва: Наука. 1984. С. 185—210.
15. Сухарева Б.С., Дарий Е.Л., Горюнов А.И., Тюлькова Н.А., Маликова Л.Г. // Биохимия. 1989. Т. 54. С. 740—744.
 16. Сухарева Б.С., Тихоненко А.С. // Мол. биол. 1972. Т. 6. С. 851—859.
 17. Христофоров Р.Р., Сухарева Б.С., Диксон Х.Б.Ф., Спаркс М.Дж., Краснов В.П., Букрина И.М., Гришаков А.Н. // Биохимия. 1996. Т. 61. С. 464—471.
 18. Хуча Т.О., Сухарева Б.С. // Докл. АН СССР. 1975. Т. 225. С. 457—459.
 19. Шульга А.А., Курбанов Ф.Т., Христофоров Р.Р., Дарий Е.Л., Сухарева Б.С. // Мол. биол. 1999. Т. 33. С. 560—566.
 20. Aaslestad H.G., Larson A.D. // J. Bacteriol. 1964. Vol. 88. P. 1296—1303.
 21. Alexander F.W., Sandmeier E., Mehta P.K., Christen P. // Eur. J. Biochem. 1994. Vol. 219. P. 953—960.
 22. Almazov V.P., Braunstein A.E., Morozov Yu.V., Sukhareva B.S. // Studia Bioph. 1976. Vol. 57. P. 191—198.
 23. Almazov V.P., Morozov Yu.V., Savin F.A., Sukhareva B.S. // Inter. Journ. Quant Chem. 1979. Vol. 16. P. 769—775.
 24. Anderson J., Chang W.H.F. // Arch. Biochem. Biophys. 1965. Vol. 110. P. 346—349.
 25. Antson A.A., Demidkina T.V., Gollnick P., Dauter Z., Von Tersch R.L., Long J. Berezchnoy S., Phillips R.S., Harutyunyan E.H., Wilson K. // Biochemistry. 1993. Vol. 32. P. 4195—4206.
 26. Areshev A.G., Mamaeva O.K., Andreeva N.S., Sukhareva B.S. // J. Biomolec. Struct. Dynam. 2000. Vol. 18. P. 127—136.
 27. Arnone A., Rogers P. H., Schmidt J., Han C—N., Harris C. M., Metzler D. E. // J. Mol. Biol. 1977. Vol. 112. P. 509—513.
 28. Bжkkeskov S., Aanstoot H.-J., Christgau S., Reetz A., Solimena M., Cascalho M., Folli F., Richter-Olesen H., De Camilli P. // Nature. 1990. Vol. 347. P. 151—156.
 29. Bailey G.B., Dempsey W.B. // Biochemistry. 1967. Vol. 6. P. 1526—1533.
 30. Blaschko H. // Adv. Enzymol. 1945. Vol. 5. P. 67—85.
 31. Boeker E.A., Snell E.E. The Enzymes. / Ed. Boyer P.D. New York: Acad. Press. 1972. Vol. 6. P. 217—253.
 32. Borisov V.V., Borisova S.N., Kachalova G.S., Sosfenov N.I., Vainshtein B.K. Torchinsky Yu.M. Braunstein A. E. // J. Mol. Biol. 1978. Vol. 125. P. 275—292.
 33. Braunstein A.E. The Enzymes. / Ed. Boyer P.D. New York: Acad. Press. 1960. Vol. 2. P. 113—184.
 34. Chessler S.D., Lernmark A. // J. Biol. Chem. 2000. Vol. 275. P. 5188—5192.
 35. Cheung S.-T., Fonda M.L. // Arch. Biochem. Biophys. 1979. Vol. 198. P. 541—547.
 36. Chu W.-C., Metzler D.E. // Arch. Biochem. Biophys. 1994. Vol. 313. P. 287—295.
 37. Davis K.M., Foos T., Bates C.S., Tucker E., Hsu C.-C., Chen W., Jin H., Tybur-sky J.B., Schloss J.V., Tobin A.J., Wu J.-Y. // Biophys. Biochem. Res. Commun. 2000. Vol. 267. P. 777—782.
 38. De Biase D., Tramonti A., John A.R., Bossa F. // Prot. Expr. Purif. 1996. Vol. 8. P. 430—438.
 39. De Frenne E., Schneider F. // Naturewissenschaften. 1970. Vol. 57. P. 498—499.
 40. Dunathan H.C. // Adv. Enzymol. 1971. Vol. 35. P. 79—134.
 41. Dunathan H.C., Voet J.G. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1966. Vol. 55. P. 712—716.
 42. Eichele G., Ford G.C., Jansonius J.N. // J. Mol. Biol. 1979. Vol. 135. P. 513—516.
 43. Erlander M.G., Tillakaratne N.J.K., Feldblum S., Patel N., Tobin A.J. // Neuron. 1991. Vol. 7. P. 91—100.
 44. Fonda M.L. // J. Biol. Chem. 1971. Vol. 246. P. 2230—2240.
 45. Fonda M. L. // Biochemistry. 1972. Vol. 11. P. 1304—1309.
 46. Fonda M.L. // Arch. Biochem. Biophys. 1972. Vol. 153. P. 763—768.

47. *Fonda M.L.* // Meth. Enzymol. 1985. Vol. 113. P. 11—16.
48. *Gale E.F.* // Biochem. J. 1940. Vol. 34. P. 392—413.
49. *Gale E.F.* // Biochem. J. 1945. Vol. 39. P. 46—58.
50. *Gale E.F.* // Adv. Enzymol. 1946. Vol. 6. P. 1—31.
51. *Gallespi L., Floris C.* // Biochem. Physiol. Pflanz. 1978. Vol. 173. P. 160—166.
52. *Gillard P., Girre L., Cormier M.* // Bull. Soc. Bot. France. 1975. Vol. 122. P. 95—107.
53. *Hunthley T.E., Metzler D.E.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1967. Vol. 26. P. 109—115.
54. *Huntley T.E., Metzler D.E.* Symposium on Pyridoxal Enzymes. / Eds. Yamada K., Katunuma N., Wada H. Tokyo: Maruzen Company Ltd. 1968. P. 81—84.
55. *Hyde C.C., Ahmed S.A., Padlan E.A., Miles E.W., Davis E.R.* // J. Biol. Chem. 1988. Vol. 263. P. 17857—17871.
56. *Inatomi K., Slaughter J.C.* // Biochem. J. 1975. Vol. 147. P. 479—484.
57. *Isupov M.N., Antson A.A., Dodson E.J., Dodson G.G., Dementieva I.S., Zakomirdina L.N., Wilson K.S., Dauter Z., Lebedev A.A., Harutyunyan E.H.* // J. Mol. Biol. 1998. Vol. 276. P. 603—623.
58. *John R.A.* // Biochim. Biophys. Acta. 1995. Vol. 1248. P. 81—96.
59. *Jung M.J., Metcalf B.W., Lippert B., Casara P.* // Biochemistry. 1978. Vol. 17. P. 2628—2632.
60. *Kalyankar G. D., Snell E. E.* // Biochemistry. 1962. Vol. 1. P. 594—600.
61. *Khriforov R.R., Sukhareva B.S., Dixon H.B.F., Sparkes M.J., Krasnov V.P., Bukrina I.M.* // Bioch. Molec. Biol. Intern. 1995. Vol. 36. P. 77—85.
62. *Kollonitsch J., Patchett A.A., Marburg S., Maycock A.L., Perkins L.M., Doldouras V.A., Duggan D.E., Aster S.D.* // Nature. 1978. Vol. 274. P. 906—908.
63. *Kuo D., Rando R.R.* // Biochemistry. 1981. Vol. 20. P. 506—511.
64. *Likos J.J., Metzler D.E.* // Fed. Proc. 1976. Vol. 35. P. 1545.
65. *Likos J.J., Ueno H., Feldhaus R.W., Metzler D.E.* // Biochemistry. 1982. Vol. 21. P. 4377—4386.
66. *Likos J.J., Ueno H., Feldhaus R.W., Metzler D.E.* // Fed. Proc. 1982. Vol. 41. P. 1281.
67. *Malashkevich V.N., De Biase D., Markovic-Housley Z., Scylunegger M.P., Bossa F., Jansonius J.N.* // Acta Cryst. 1998. Vol. 54. P. 1020—1022.
68. *Mandales S., Koppelman R., Hanke M.E.* // J. Biol. Chem. 1954. Vol. 209. P. 527—536.
69. *Maras B., Sweeney G., Barra D., Bossa F., John R.A.* // Eur. J. Biochem. 1992. Vol. 204. P. 93—98.
70. *Markovic-Housley Z., Kania M., Vincent M.G., Jansonius J.N., John R.A.* Biochemistry of Vitamin B₆. / Eds. Korpela T., Christen P. Basel: Birkhauser Verlag. 1987. P. 187—190.
71. *Martin D.L., Meeley M.R., Martin S.B., Pedersen S.* // Brain Res. Bull. 1980. Vol. 5. P. 57—61.
72. *Mechanik M. L., Torchinsky Yu. M., Florentiev V. L., Karpeisky M. Ya.* // FEBS Lett. 1971. Vol. 13. P. 177—180.
73. *Meister A.* // Ann. N.Y. Acad. Sci. 1990. Vol. 58. P. 13—31.
74. *Melius P.* // Canad. J. Biochem. 1966. Vol. 44. P. 145—147.
75. *Metzler D. E., Ikawa M., Snell E. E.* // J. Am. Chem. Soc. 1954. Vol. 76. P. 648—652.
76. *Momany C., Ernst S., Ghosh R., Chang N.-L., Hackert M.L.* // J. Mol. Biol. 1995. Vol. 252. P. 643—655.
77. *Momany C., Ghosh R., Hackert M.L.* // Prot. Sci. 1995. Vol. 4. P. 849—854.
78. *Mora C., Miguel A., Echandi Z.* // Turrialba. 1976. Vol. 26. P. 413—416.
79. *Novogrodsky A., Meister A.* // J. Biol. Chem. 1964. Vol. 239. P. 879—888.
80. *Qu K., Martin D.L., Lawrence C.E.* // Prot. Sci. 1998. Vol. 7. P. 1092—1105.

81. *Rose J. E., Leeson P. D., Gani D.* // J. Chem. Soc., Chem. Commun. I. 1992. P. 1784—1786.
82. *Rose J.E., Leeson P.D., Gani D.* // J. Chem. Perkin Trans. I. 1994. P. 3089—3094.
83. *Salzmann D., Christen P., Mehta P.K., Sandmeier E.* // Biophys. Biochem. Res. Commun. 2000. Vol. 270. P. 576—580.
84. *Sandmeier E., Hale T.I., Christen P.* // Eur. J. Biochem. 1994. Vol. 221. P. 997—1002.
85. *Sastchenko L.P., Severin E.S., Metzler D.E., Khomutov R. M.* // Biochemistry. 1971. Vol. 10. P. 4888—4894.
86. *Schaes O.* The Enzymes. / Eds. Sumner J.B. and Myrback K. New York: Acad. Press. 1951. Vol. 2. P. 216—247.
87. *Schirlin D., Ducer J.B., Baltzer S., Bey P., Piriou F., Wagner J., Hornsperger J.M., Heydt J.G., Jung M.J., Danzin C., Weiss R., Fischer J., Mitschler A., De Cian A.* // J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1992. P. 1053—1063.
88. *Shukuya R., Schwert G.W.* // J. Biol. Chem. 1960. Vol. 235. P. 1649—1652.
89. *Shukuya R., Schwert G.W.* // J. Biol. Chem. 1960. Vol. 235. P. 1653—1657.
90. *Shukuya R., Schwert G.W.* // J. Biol. Chem. 1960. Vol. 235. P. 1658—1661.
91. *Smith D.K., Kassam T., Singh B., Elliot G.F.* // J. Bacteriol. 1992. Vol. 174. P. 5820—5826.
92. *Strausbauch P.H., Fischer E.H.* // Biochemistry. 1970. Vol. 9. P. 226—233.
93. *Strausbauch P.H., Fischer E.H.* // Biochemistry. 1970. Vol. 9. P. 233—238.
94. *Sukhareva B.S., Torchinsky Yu.M.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1966. Vol. 25. P. 585—589.
95. *Sukhareva B.S., Dunathan H.C., Braunstein A.E.* // FEBS Lett. 1971. Vol. 15. P. 241—244.
96. *Sukhareva B.S.* Coenzymes and co-factors. / Eds. Dolphin D., Poulson R., Avramovic O. N.Y. Wiley and sons. 1986. Vol. 1B. P. 325—353.
97. *Tichonenko A.S., Sukhareva B.S., Braunstein A.E.* // Biochim. Biophys. Acta. 1968. Vol. 167. P. 476—479.
98. *Tillakaratne N.J.K., Erlander M.G., Collard M W., Greif K.F., Tobin A.J.* // J. Neurochem. 1992. Vol. 58. P. 618—627.
99. *To C.M.* // J. Mol. Biol. 1971. Vol. 59. P. 215—217.
100. *Tramonti A., De Biase D., Gartosio A., Bossa F., John R.A.* // J. Biol. Chem. 1998. Vol. 273. P. 1939—1945.
101. *Weipert D.* // Getreide. Mehl. Brot. 1972. Vol. 26. P. 123—124.
102. *Wu J.-Y., Denner L., Lin C.-T., Song G.L.* // Meth. Enzymol. 1985. Vol. 113. P. 3—10.