



УДК 577.152.141*3'13

СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ГЕКСАМЕРА
ГЛУТАМАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ
2.* ИЗУЧЕНИЕ ИНАКТИВАЦИИ И ДИССОЦИАЦИИ
ИММОБИЛИЗОВАННОГО ГЕКСАМЕРА ПОД ВЛИЯНИЕМ
МОЧЕВИНЫ

*Карабамян Л. В., Агаджанян С. А., Даноян К. В.,
Казарян Р. А.*

*Институт экспериментальной биологии Академии наук АрмССР,
Ереван*

Используя в качестве модели иммобилизованное на ВrCN-активированной сефарозе CL-4B радиоактивное фосфопиридоксильное производное глутаматдегидрогеназы (*L*-глутамат: NAD(P)-оксидоредуктазы, КФ 1.4.1.3) печени быка, изучали индуцируемую мочевиной инактивацию и диссоциацию каталитически активного гексамера фермента. Показано, что в области нейтральных значений pH (7,0–7,8) мочевиной индуцирует диссоциацию глутаматдегидрогеназы до каталитически неактивных иммобилизованных мономеров, минуя стадию образования низкомолекулярных фрагментов гексамера. При изменении pH до 8,9 или 5,6 индуцируемая мочевиной диссоциация гексамера до мономеров проходит через стадии образования конформационно устойчивых иммобилизованных димеров или тримеров соответственно. Образующиеся при этом иммобилизованные тримеры обладают каталитической активностью, в то время как димеры ферментативной активности не проявляют. Полученные результаты позволяют рассматривать гексамер как структуру, состоящую либо из трех эквивалентных димеров ($3\alpha_2$), либо из двух эквивалентных тримеров ($2\alpha_3$).

Каталитически активная единица глутаматдегидрогеназы печени быка представляет собой гексамер, сформированный из идентичных по аминокислотной последовательности субъединиц [2, 3]. В предыдущей работе [1] нами было показано, что гексамер глутаматдегидрогеназы, иммобилизованный на ВrCN-активированной сефарозе CL-4B посредством вовлечения в ковалентную связь с носителем одной из субъединиц, практически не отличается от растворимого фермента по каталитическим и регуляторным свойствам. Одновременно было показано, что иммобилизованное фосфопиридоксильное производное глутаматдегидрогеназы (полученное путем модификации нативного фермента пиридоксаль-5'-фосфатом в присутствии NADH, 2-оксоглутарата и GTP) полностью имитирует иммобилизованную в аналогичных условиях нативную глутаматдегидрогеназу.

В настоящей работе с использованием в качестве модели радиоактивной формы иммобилизованного фосфопиридоксильного производного глутаматдегидрогеназы предпринята попытка получения информации о структурной организации гексамера фермента. С этой целью были исследованы процессы инактивации и диссоциации иммобилизованных производных глутаматдегидрогеназы, индуцируемые мочевиной при различных значениях pH.

Анализ активности растворимого фосфопиридоксильного производного глутаматдегидрогеназы в зависимости от концентрации мочевины после инкубации фермента в течение 30 мин в средах, содержащих денатурирующий агент при различных значениях pH (рис. 1а), показывает, что резистентность производного фермента к инактивации мочевиной зависит от pH инкубационной среды. Концентрация мочевины, при которой происходит полуинактивация фермента, смещается от 3,5 М при pH 7,0 или 7,8 до 1,5 или 1,0 М при изменении pH до 5,6 или 8,9 соответственно.

* Сообщение 1 см [1].

При аналогичных значениях рН инкубационной среды иммобилизованное фосфопиридоксильное производное глутаматдегидрогеназы обладает повышенной по сравнению с растворимым образцом устойчивостью к инактивации мочевиной (рис. 1б). Вместе с тем, как и в случае растворимого фермента, изменение рН инкубационной среды от нейтральных значений до 5,6 или 8,9 приводит к заметному понижению устойчивости фермента к инактивирующему действию мочевины. Подобные закономерности наблюдались также для растворимого и иммобилизованного образцов нативного фермента. Приведенные данные свидетельствуют о зависимости устойчивости глутаматдегидрогеназы к инактивирующему действию мочевины от ионного состояния заряженных групп белка. По всей вероятности, эти ионогенные группы принимают участие в формировании и стабилизации нативной конформации каталитически активного гексамера глутаматдегидрогеназы. С целью выяснения этого вопроса была изучена диссоциация иммобилизованного фосфопиридоксильного производного глутаматдегидрогеназы в зависимости от концентрации мочевины при различных значениях рН.

Как видно из рис. 1в, при рН 7,0 и 7,8 в интервале концентраций мочевины 4,0–5,0 М с носителя диссоциирует ~85% иммобилизованного белка. Поскольку гексамер глутаматдегидрогеназы иммобилизован на носителе посредством ковалентной фиксации одной из субъединиц, следует заключить, что в этих условиях фермент диссоциирует до мономеров, минуя стадию образования устойчивых низкомолекулярных олигомерных фрагментов гексамера.

Сходные результаты были получены при изучении диссоциации глутаматдегидрогеназы, иммобилизованной на сефарозе 4В, модифицированной пиридоксаль-5'-фосфатом [4]. В качестве денатурирующего агента в этой работе был использован гуанидинийхлорид. Следует отметить, что эти данные не согласуются с результатами изучения диссоциации растворимой глутаматдегидрогеназы, проведенного методом светорассеяния [5]. Согласно последней публикации, гуанидинийхлорид вызывает двухступенчатую диссоциацию гексамера. При низких концентрациях денатурирующего агента (0,6–1,0 М) происходит обратимая диссоциация гексамера до тримеров, а при концентрациях выше 2,0 М тримеры необратимо диссоциируют до мономеров. Однако необходимо отметить, что результаты этой работы не были подтверждены при седиментационных исследованиях растворимой глутаматдегидрогеназы

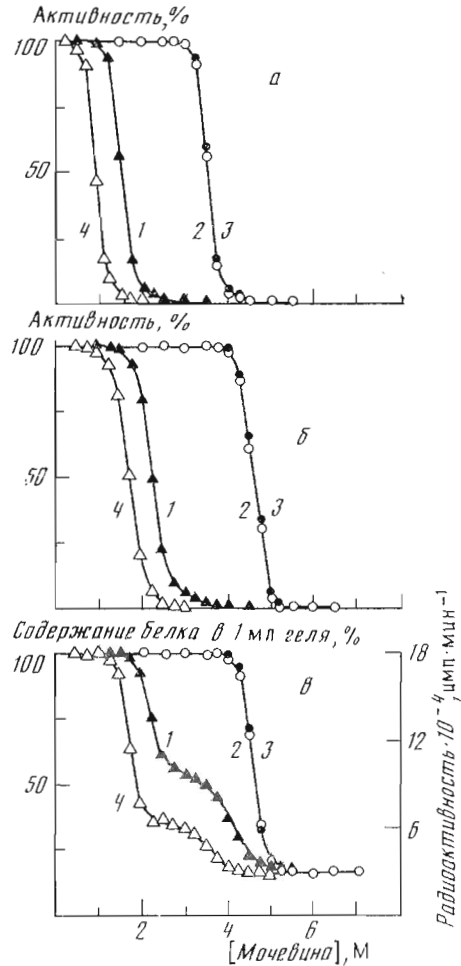


Рис. 1. Зависимости активности растворимого (а) и иммобилизованного (б) фосфопиридоксильного производного глутаматдегидрогеназы, а также содержания иммобилизованного белка (в), в расчете на 1 мл осевшего геля сефарозы, от концентрации мочевины после инкубации образцов фермента в средах, содержащих мочевины при различных значениях рН. Инкубацию проводили при рН 5,6 (1); 7,0 (2); 7,8 (3) и 8,9 (4) при 25°С в течение 30 мин

зы в присутствии различных концентраций гуанидинийхлорида [4]. Этим же методом ранее [6] было показано, что в присутствии гуанидинийхлорида растворимая глутаматдегидрогеназа диссоциирует до мономеров, минуя стадию образования тримеров. Все данные получены при обработке фермента денатурирующими агентами при нейтральных значениях рН.

Суммируя, необходимо отметить, что приведенные результаты не дают оснований для однозначного заключения о том, что при нейтральных значениях рН гексамер глутаматдегидрогеназы способен диссоциировать до конформационно устойчивых низкомолекулярных олигомерных фрагментов. Вместе с тем, как это видно из рис. 1а, при изменении рН инкубационной среды до 8,9 или 5,6 диссоциация иммобилизованного фосфопиридоксильного производного глутаматдегидрогеназы происходит в две ступени. При рН 8,9 в интервале концентраций мочевины 1,2–2,2 М происходит диссоциация гексамера до димеров, которые до 3,2 М мочевины сохраняют олигомерную структуру. Диссоциация же иммобилизованных димеров до мономеров происходит в области концентраций мочевины 3,2–4,0 М.

Несколько иная картина наблюдается при инкубации иммобилизованного фермента в средах, содержащих мочевину при рН 5,6. Гексамер в области концентраций мочевины 1,7–2,7 М диссоциирует до тримера. Последний диссоциирует до мономеров в интервале концентраций мочевины 3,5–4,5 М. Полученные данные показывают, что в зависимости от рН гексамер глутаматдегидрогеназы, иммобилизованный на ВгСN-активированной сефарозе, под влиянием мочевины способен диссоциировать либо до димеров, либо до тримеров. Эти результаты согласуются с представлением о структурной организации гексамера с эквивалентной ориентацией субъединиц, предложенной ранее [7] на основании изучения каталитических и регуляторных свойств фосфопиридоксильных производных глутаматдегидрогеназы.

На рис. 2 приведена физическая модель гексамера глутаматдегидрогеназы, которая принадлежит группе точечной симметрии 32 в виде треугольной призмы [8]. Там же приведена развертка этой модели с учетом эквивалентной ориентации субъединиц [7]. Согласно данному представлению, устойчивость гексамера обеспечивается межсубъединичными контактами двух типов: изоэологическим aa и гетерологическим pq . Очевидно, что при подобной структурной организации гексамера диссоциация изоэологических контактов приведет к образованию двух идентичных тримеров, в то время как при диссоциации гетерологических контактов образуются три идентичных димера. В рамках этих представлений данные рис. 1а позволяют заключить, что при рН 5,6 в области концентраций мочевины 1,7–2,7 М происходит диссоциация изоэологических контактов aa . В то же время при рН 8,9 мочевина в области концентраций 1,2–2,2 М индуцирует диссоциацию гетерологических контактов pq . Сопоставление этих результатов с данными по диссоциации иммобилизованного гексамера при нейтральных значениях рН позволяет полагать, что в обеспечении устойчивости изоэологических контактов, диссоциирующих при рН 5,6, принимает участие группа с рК ионизации ниже 7,0. В то же время в обеспечении устойчивости гетерологических контактов, диссоциирующих при рН 8,9, участвует группа белка с рК ионизации выше 7,8. По всей видимости, в области нейтральных значений рН состояние ионизации этих групп обеспечивает наибольшую устойчивость как изоэологических, так и гетерологических контактов. Вследствие этого при нейтральных значениях рН гексамер проявляет наибольшую устойчивость к диссоциации мочевиной.

Таким образом, полученные результаты согласуются с представлением об эквивалентной взаимной ориентации субъединиц в составе каталитически активного гексамера глутаматдегидрогеназы. Эти данные позволяют рассматривать гексамер глутаматдегидрогеназы как систему, состоящую: 1) из двух эквивалентных тримеров ($2\alpha_3$), в которых субъединицы взаимодействуют посредством гетерологических контактов; 2) из трех эквивалентных димеров ($3\alpha_2$), в которых субъединицы взаимодействуют посредством изоэологических контактов.

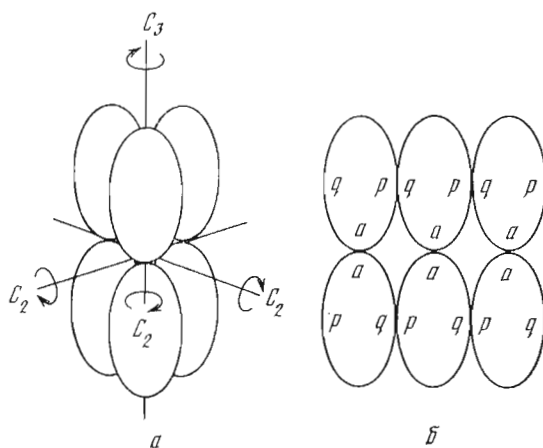


Рис. 2. Структурная модель гексамера глутаматдегидрогеназы (а) и его схематическая развертка (б) с учетом эквивалентной ориентации субъединиц. а, р и q — контактные участки субъединиц

Сопоставление данных, приведенных на рис. 1б, в, свидетельствует, что интервалы концентраций мочевины, при которых происходит инактивация фермента и его диссоциация до мономеров, димеров или тримеров, при соответствующих значениях рН практически совпадают. Эти данные, очевидно, говорят о том, что иммобилизованные олигомерные фрагменты глутаматдегидрогеназы, образующиеся в результате диссоциации иммобилизованного гексамера (при его инкубации в средах, содержащих мочевины, в течение 30 мин), не обладают каталитической активностью. Однако эти данные не позволяют заключить, что фермент инактивируется в результате диссоциации гексамера. Не исключено, что после диссоциации гексамера образующиеся иммобилизованные фрагменты теряют каталитическую активность в результате последующей конформационной изомеризации, индуцируемой присутствующей в среде мочевиной. Для выяснения этого вопроса были изучены кинетические зависимости процессов инактивации и диссоциации иммобилизованных производных глутаматдегидрогеназы при различных значениях рН.

Проведенные исследования показали, что процессы инактивации и диссоциации до мономеров при рН 7,0 и 7,8 или до димеров при рН 8,9 подчиняются кинетике реакций первого порядка. В таблице приведены значения констант скоростей этих процессов при различных концентрациях мочевины. Видно, что при выбранных концентрациях мочевины константы скоростей инактивации фермента практически совпадают с константами скоростей процессов диссоциации гексамера до мономеров

Константы скорости процессов инактивации и диссоциации иммобилизованного фосфопиридоксального производного глутаматдегидрогеназы, индуцируемых мочевиной при различных рН инкубационной среды

рН	Концентрация мочевины, М	k, мин ⁻¹	
		инактивации	диссоциации
7,0	5,0	0,12	0,12
	5,5	0,27	0,26
7,8	5,0	0,13	0,12
	5,5	0,27	0,29
8,9	2,5	0,16	0,18
	3,0	0,42	0,45

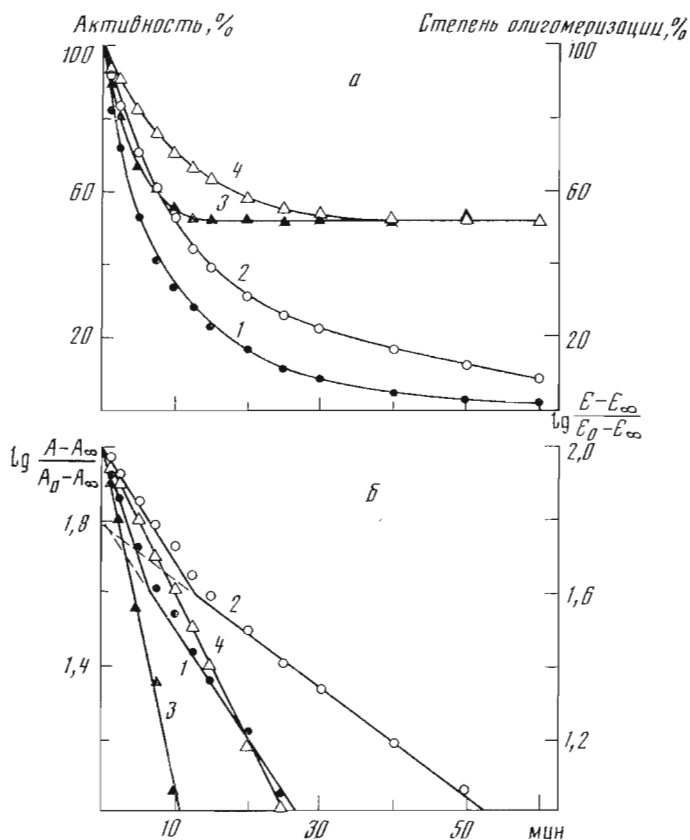


Рис. 3. *a* — кинетика инактивации (1, 2) и диссоциации (3, 4) иммобилизованного фосфопиридоксильного производного глутаматдегидрогеназы при его инкубации в средах, содержащих 3,0 М (1, 3) и 2,5 М (2, 4) мочевины при рН 5,6. *б* — те же зависимости в полулогарифмических координатах. Степень олигомеризации — содержание белка, остающегося иммобилизованным на 1 мл геля после его обработки мочевиной, относительно количества иммобилизованного белка, не подвергнутого подобной обработке

(при рН 7,0 и 7,8) или димеров (при рН 8,9). Эти данные свидетельствуют о том, что полученные иммобилизованные низкомолекулярные фрагменты гексамера глутаматдегидрогеназы не проявляют каталитической активности.

Иная картина наблюдается при изучении процессов диссоциации и инактивации иммобилизованного фосфопиридоксильного производного глутаматдегидрогеназы при рН 5,6. Как видно из рис. 3а, процесс диссоциации гексамера до тримеров полностью завершается через 12 мин инкубации образца фермента в растворе, содержащем 3 М мочевины. За тот же промежуток времени ферментативная активность образца понижается лишь на 70%. Эти результаты свидетельствуют о том, что образовавшийся в результате диссоциации гексамера иммобилизованный тример обладает каталитической активностью. Однако под действием присутствующей в инкубационной среде мочевины образовавшийся тример по истечении 60 мин после начала инкубации полностью теряет каталитическую активность. Из рис. 3а видно, что аналогичные закономерности наблюдаются при инкубации иммобилизованного производного фермента в средах, содержащих 2,5 М мочевины. При этом, как видно из данных по диссоциации, не происходит изменения степени олигомерности тримера. Отсюда можно заключить, что потеря каталитической активности тримером обусловлена его конформационной изомеризацией, индуцируемой присутствующей в среде мочевиной.

Согласно кинетическим зависимостям процессов инактивации и дис-

социации иммобилизованного фермента в полулогарифмических координатах, процесс диссоциации подчиняется кинетике реакций первого порядка (рис. 3б). В отличие от диссоциации кинетическая зависимость инактивации не описывается уравнением реакций первого порядка и, в грубом приближении, аппроксимируется двумя линейными участками. Очевидно, что первая (быстрая) стадия инактивации обусловлена как диссоциацией гексамера до иммобилизованного тримера, так и конформационной изомеризацией последнего до каталитически неактивного состояния. Вторая же (медленная) стадия инактивации обусловлена лишь конформационной изомеризацией образованного иммобилизованного тримера. Для оценки каталитической активности иммобилизованного тримера кинетические зависимости второй (медленной) стадии инактивации фермента были экстраполированы до пересечения с осью ординат (рис. 3б). Отсюда следует, что каталитическая активность тримера глутаматдегидрогеназы в момент диссоциации гексамера составляет ~60% активности гексамера. Аналогичные зависимости наблюдались при изучении кинетики инактивации нативной глутаматдегидрогеназы, иммобилизованной на BrCN-активированной сефарозе CL-4B. Вместе с тем изучение кинетики инактивации растворимых форм нативного фермента и его фосфопиридоксильного производного показало, что при всех значениях pH, включая pH 5,6, инактивация фермента описывается кинетической зависимостью первого порядка независимо от концентрации мочевины. Эти данные позволяют предполагать, что образующиеся в результате диссоциации растворимые тримеры подвергаются быстрой изомеризации до каталитически неактивного конформера либо диссоциируют до каталитически неактивных мономеров. Возможность обнаружения каталитически активного иммобилизованного тримера, по всей вероятности, обусловлена стабилизирующим влиянием на него матрицы носителя.

Таким образом, согласно проведенным исследованиям, тример глутаматдегидрогеназы, в котором субъединицы взаимодействуют посредством идентичных гетерологических контактов, обладает ферментативной активностью. Эти результаты свидетельствуют о том, что в формировании активных центров глутаматдегидрогеназы могут принимать участие группы, принадлежащие различным субъединицам, взаимодействующим в рамках тримеров α_3 . Вместе с тем результаты настоящей работы показывают, что изологические межсубъединичные контакты, посредством которых осуществляется взаимодействие тримеров в составе гексамера, не являются необходимыми для формирования активных центров глутаматдегидрогеназы. Одна из функций этих контактов, по всей видимости, заключается в поддержании нативной конформации активных центров фермента. Кроме того, не исключено, что эти контакты, так же как и гетерологические, могут принимать участие в обеспечении кооперативного поведения глутаматдегидрогеназы в катализируемых реакциях [9, 10] и при взаимодействии со специфическими лигандами [11—14].

Экспериментальная часть

В работе использовали следующие реактивы: NADH, 2-оксоглутарат, β -меркаптоэтанол (Sigma, США), GTP, пиридоксаль-5'-фосфат (Serva, ФРГ), EDTA (Reanal, Венгрия), BrCN (Merck, ФРГ), NaBH₄ (Koch-Light Laboratories Ltd, Англия), NaB(³H)₄ (удельная радиоактивность 205 мКи/мг; Amersham, Англия). Остальные реагенты — отечественного производства, квалификации ос.ч.

Глутаматдегидрогеназу из печени быка (уд. акт. 34 ед/мг белка; за единицу активности принято количество белка, которое катализирует превращение 1 мкмоль NADH в 1 мин в процессе реакции восстановительного аминирования 2-оксоглутарата) выделяли по методу, описанному ранее [15].

Фосфопиридоксильное производное глутаматдегидрогеназы и его радиоактивную форму (25 мКи/мг белка) получали согласно методам, описанным ранее [1, 16].

Иммобилизацию глутаматдегидрогеназы и ее фосфопиридоксильного производного на сефарозе CL-4B, активированной BrCN, проводили аналогично [1]. С целью иммобилизации фермента посредством вовлечения в ковалентную связь с носителем лишь одной из субъединиц гексамера активацию сефарозы проводили, используя 2,5 мг BrCN на 1 мл осевшего геля, как это описано ранее [1]. Полученный препарат иммобилизованного фермента содержал 5,5 мкг белка на 1 мл осевшего геля сефарозы.

Концентрацию глутаматдегидрогеназы в растворе определяли спектрофотометрически, принимая коэффициент поглощения при 280 нм равным $0,97 \text{ (см} \cdot \text{мг/мл)}^{-1}$ [17]. Содержание белка в образцах фосфопиридоксильного производного глутаматдегидрогеназы определяли по радиоактивности геля, сравнивая ее с удельной радиоактивностью растворимого фосфопиридоксильного производного фермента. Радиоактивность измеряли в сцинтилляторе Брея [18] на счетчике SL-4221 (Франция), как описано в работе [1].

Активность растворимых и иммобилизованных препаратов глутаматдегидрогеназы определяли по скорости изменения экстинкции NADH при 340 нм в процессе реакции восстановительного аминирования 2-оксоглутарата согласно методу, описанному ранее [1].

Для определения уровней инактивации и диссоциации иммобилизованного производного глутаматдегидрогеназы, индуцируемых мочевиной, 200 мкл осевшего геля суспендировали в 2 мл раствора мочевины в 0,1 М калий-фосфате, содержащем 10^{-2} М β -меркаптоэтанол и 10^{-3} М EDTA, при различных значениях pH (5,6; 7,0; 7,8 и 8,9) и инкубировали при непрерывном перемешивании в течение 30 мин при 25°С. По истечении времени инкубации суспензию отфильтровывали и последовательно промывали 5 объемами инкубационной смеси и 10 объемами 0,01 М калий-фосфатного буфера, pH 7,2. Активность полученного после обработки мочевиной препарата иммобилизованного фермента и содержание белка на 1 мл геля определяли по описанным выше методам.

ЛИТЕРАТУРА

1. Карабашян Л. В., Агаджанян С. А., Данолян К. В., Казарян Р. А. // Биоорганик. химия. 1988. Т. 14. № 11. С. 1495–1501.
2. Eisenberg H., Tomkins C. M. // J. Mol. Biol. 1968. V. 31. № 1. P. 37–49.
3. Moon K., Smith E. L. // J. Biol. Chem. 1973. V. 248. № 9. P. 3082–3088.
4. Аветисян С. Г., Агаджанян С. А., Казарян Р. А., Карабашян Л. В. // Биоорганик. химия. 1986. Т. 12. № 3. С. 332–339.
5. Tashiro R., Inoue T., Shimozawa R. // Biochim. et biophys. acta. 1982. V. 706. № 1. P. 129–135.
6. Сугробова Н. П., Гуревич В. М., Чеботарева Н. А., Курганов Б. П. // Биохимия. 1979. Т. 44. № 3. С. 424–431.
7. Агаджанян С. А., Карабашян Л. В. // Молекуляр. биология. 1986. Т. 20. № 4. С. 1070–1078.
8. Eisenberg H., Reisler E. // Biopolymers. 1970. V. 9. № 1. P. 113–115.
9. Engel P. C., Dalziel K. // Biochem. J. 1969. V. 115. № 4. P. 621–631.
10. Dalziel K., Engel P. C. // FEBS Lett. 1968. V. 1. № 5. P. 349–352.
11. Dalziel K., Egan R. R. // Biochem. J. 1972. V. 126. № 4. P. 975–984.
12. Alex S., Bell E. J. // Biochem. J. 1980. V. 191. № 2. P. 299–304.
13. Krause J., Bühner M., Sund H. // Eur. J. Biochem. 1974. V. 41. № 3. P. 593–602.
14. George A., Bell E. J. // Biochemistry. 1980. V. 19. № 26. P. 6057–6061.
15. Агаджанян С. А., Арутюнян А. А., Карабашян Л. В. // Биоорганик. химия. 1984. Т. 10. № 9. С. 1171–1176.
16. Агаджанян С. А., Погосян А. А., Карабашян Л. В. // Молекуляр. биология. 1986. Т. 20. № 3. С. 737–744.
17. Olson J. A., Anfinsen C. B. // J. Biol. Chem. 1952. V. 197. № 1. P. 67–79.
18. Bray G. A. // Anal. Biochem. 1960. V. 1. № 1. P. 279–285.

Поступила в редакцию
28.III.1988

STRUCTURAL ORGANIZATION OF HEXAMER OF GLUTAMATE DEHYDROGENASE.

2. INVESTIGATION OF UREA-INDUCED INACTIVATION AND DISSOCIATION OF THE IMMOBILIZED HEXAMER

KARABASHIAN L. V., AGHADJANIAN S. A., DANOYAN K. V., KAZARYAN R. A.

*Institute of Experimental Biology,
Academy of Sciences of the Armenian SSR, Yerevan*

The urea-induced inactivation and dissociation of catalytically active hexamer of glutamate dehydrogenase (*L*-glutamate-NAD(P)-oxidoreductase, EC 1.4.1.3) from bovine liver were studied using radioactive phosphopyridoxyl derivative of the enzyme immobilized on cyanogen bromide-activated Sepharose CL-4B. It is shown that at neutral pH (7,0–7,8) urea causes dissociation of glutamate dehydrogenase to directly yield catalytically inactive immobilized monomers rather than hexamer's stable fragments at the same time. At pH 8,9 or 5,6 the urea-induced is accompanied by the formation of conformationally stable immobilized dimers or trimers, respectively. The trimers are catalytically active, whereas the dimers did not exhibit any enzymatic activity. The data obtained led to suggestion that the hexamer consists of three either equivalent dimers ($3\alpha_2$) or of two equivalent trimers ($2\alpha_3$).