



УДК 577.158.45.047

МОДИФИКАЦИЯ ТЕТРАНИТРОМЕТАНОМ
АСПАРТАТ-ТРАНСАМИНАЗЫ ИЗ ЦИТОЗОЛЯ
СЕРДЦА КУР*Кочкина В. М., Волкова Г. А., Торчинский Ю. М.**Институт молекулярной биологии Академии наук СССР,
Москва*

Исследована модификация тетранитрометаном остатков тирозина и цистеина в апо- и холоферменте аспартат-трансаминазы из цитозоля сердца кур. Найдено, что $C(NO_2)_4$ легко окисляет одну SH-группу фермента. Окисление второй, частично маскированной SH-группы происходит медленно в присутствии значительного избытка $C(NO_2)_4$. Обработка холодотрансаминазы 60-кратным молярным избытком $C(NO_2)_4$ при pH 8 в отсутствие субстратов приводит к образованию 0,8 остатка нитротирозина; в тех же условиях в присутствии субстратов образуется 1,65 остатка нитротирозина. Ферментативная активность снижается на 13% при нитровании в отсутствие субстратов и на 35% в присутствии субстратов. Нитрованный апофермент сохраняет в значительной мере способность связывать пиридоксальфосфат.

До настоящего времени большинство исследований по химической модификации аспартат-трансаминазы (КФ 2.6.1.1) было выполнено с использованием фермента из цитозоля свиных сердец [1]. Активность этого фермента резко подавляется рядом тиоловых реагентов и тетранитрометаном. Тетранитрометан в мягких условиях избирательно нитрует остатки тирозина и окисляет SH-группы в белках [2, 3]. Демидкина и соавт. [4] нашли, что в аспартат-трансаминазе свиньи нитрованию тетранитрометаном доступны три остатка тирозина, причем один остаток, а именно Туг-40, реагирует с наибольшей скоростью, особенно в присутствии субстратов. По данным Бирчмайера и соавт. [5], нитрование тирозина в аспартат-трансаминазе свиньи облегчается предварительным окислением или алкилированием остатка Cys-390. Авторы работ [6—8] высказали предположение, что остатки цистеина и тирозина входят в состав активного центра аспартат-трансаминазы свиньи. В целях выяснения роли этих остатков мы решили провести их модификацию в одноименном ферменте из цитозоля сердца кур. Известно, что существенные аминокислотные остатки в белке, как правило, сохраняются в процессе эволюции, тогда как замещение одного аминокислотного остатка другим считается доказательством его несущественности для функции фермента. Ранее нами [9, 10] найдено, что аспартат-трансаминаза из цитозоля сердца кур содержит в расчете на мономер 4 остатка цистеина: один легко доступный, один частично маскированный и два полностью замаскированных. В отличие от одноименного фермента свиньи, трансаминаза кур не содержит SH-группу, блокирование которой приводит к резкому подавлению активности; она также не содержит SH-группу, реакционная способность которой зависит от присутствия субстратов.

Реакция аспарат-трансминазы с тетранитрометаном

60-кратный молярный избыток $C(NO_2)_4$; 0,05 М трис-НСl-буфер, рН 8,0

Время инкубации, мин.	Наличие пары субстратов в инкубационной смеси *	Число нитрованных остатков тирозина	Число окисленных SH-групп	Активность, % от контроля **
30	—	0,48	1,4	92
То же	+	1,12	1,3	76
60	—	0,77	1,2	87
То же	+	1,28	1,5	73
90	—	0,77	1,6	87
То же	+	1,65 ***	2,0	65
120	—	0,81	1,7	87
То же	+	1,65	2,0	65

* Инкубационная смесь содержала 10,8 мМ $C(NO_2)_4$ и 0,18 мМ фермент; в качестве субстратной пары использовали 70 мМ L-глутамат и 2 мМ α -кетоглутарат.

** Контрольная проба содержала фермент или фермент + пара субстратов в отсутствие $C(NO_2)_4$.

*** Нами установлено, что прекращение дальнейшего образования нитротирозина после 90 мин инкубации не может быть объяснено частичным разложением $C(NO_2)_4$ за это время.

Эти данные позволили заключить, что SH-группы незначительны для активности аспарат-трансминазы [9, 10].

Данная работа посвящена модификации при помощи $C(NO_2)_4$ аспарат-трансминазы из цитозоля сердца кур. Опыты были проведены с холо- и апоферментом, было изучено влияние субстратов на нитрование холофермента. Предварительное сообщение об этой работе опубликовано [9].

Взаимодействие тетранитрометана с холо-трансминазой. Мы нашли, что степень модификации аспарат-трансминазы под действием $C(NO_2)_4$ зависит от молярного избытка реагента, рН, времени инкубации и присутствия субстратов. Инкубирование фермента с 15-кратным молярным избытком $C(NO_2)_4$ в отсутствие субстратов при рН 8,0 или 5,2 приводит к окислению 1,0—1,2 SH-группы; при этом не происходит снижения активности фермента и нитрование остатков тирозина. Окисление SH-группы при рН 8,0 протекает быстрее, чем при рН 5,2 (время, необходимое для полного окисления, составляет соответственно ~ 5 и ~ 30 мин). После обработки $C(NO_2)_4$ фермент утрачивает способность реагировать с 5,5'-дитиобис(2-нитробензоатом) в отсутствие денатурирующих агентов. Известно, что лишь одна SH-группа нативной трансминазы реагирует с 5,5'-дитиобис(2-нитробензоатом), а также с иодацетамидом и N-этилмалеимидом [9, 10]. Из приведенных данных следует, что $C(NO_2)_4$ легко окисляет в нативном ферменте ту же SH-группу, которая доступна дисульфидным и алкилирующим реагентам.

При обработке трансминазы 60-кратным молярным избытком $C(NO_2)_4$ при рН 8,0 в отсутствие субстратов происходит образование максимум 0,8 остатка нитротирозина; в тех же условиях в присутствии пары субстратов (L-глутамата и α -кетоглутарата) наблюдается образование 1,65 остатка нитротирозина (см. рис. 1 и таблицу). Одновременно с нитрованием тирозина происходит медленное окисление второй, частично маскированной SH-группы белка (см. таблицу). Ферментативная активность снижается на 10—13% при нитровании в отсутствие субстратов и на 35% при проведении нитрования в присутствии субстратов. Влияние субстратной пары на нитрование свидетельствует о том, что взаимодействие фермента с субстратами сопровождается изменением конформации белка, которое делает доступным для $C(NO_2)_4$ еще один или несколько (частично модифицируемых) остатков тирозина. Эти остатки явно незначительны, так как их модификация вызывает дополнительное снижение ферментативной активности лишь на 22%. Нитрование холофермента в отсутствие субстратов не вызывало из-

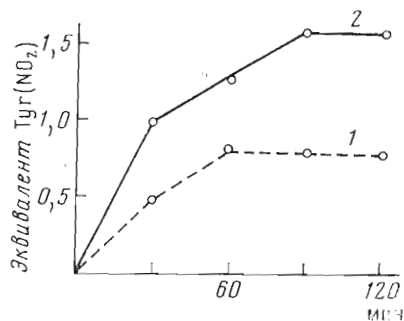


Рис. 1

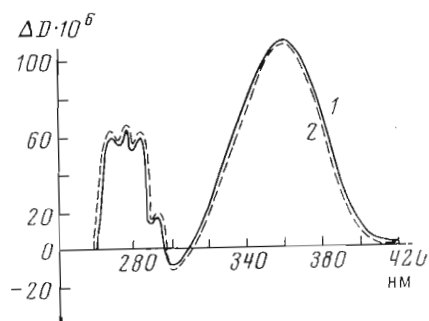


Рис. 2

Рис. 1. Нитрование холодтрансаминазы (0,18 мМ) в присутствии 60-кратного молярного избытка $C(NO_2)_4$ (10,8 мМ): 1 — ход нитрования остатков тирозина в отсутствие субстратов; 2 — то же в присутствии 70 мМ *L*-глутамата и 2 мМ α -кетоглутарата

Рис. 2. Спектры КД холодтрансаминазы в 0,05 М трис-НСl-буфере (рН 8,0) до (кривая 1) и после (кривая 2) обработки 60-кратным молярным избытком $C(NO_2)_4$ в отсутствие субстратов. Концентрация белка — 0,4 мг/мл

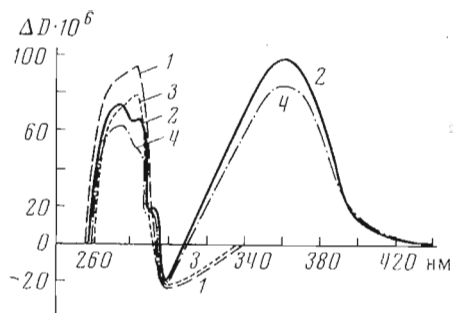
менений в спектрах КД в полосах поглощения кофермента и ароматических аминокислот (рис. 2).

Описанные выше опыты не обнаружили существенного для ферментативной активности остатка тирозина в аспарат-трансаминазе кур. Можно было думать, что такой остаток все же существует, но экранирован в холодферменте молекулой пиридоксальфосфата и поэтому недоступен для $C(NO_2)_4$. Для проверки этого предположения были проведены опыты с апоферментом.

Взаимодействие тетранитрометана с апотрансаминазой. При обработке апофермента 15-кратным молярным избытком $C(NO_2)_4$ (1 ч, рН 8,0) происходит образование $\sim 0,3$ остатка нитротирозина и окисление 1,3 SH-группы с сопутствующим снижением активности на 15%. Обработка апофермента 60-кратным избытком $C(NO_2)_4$ (1 ч, рН 8,0) приводит к нитрованию 0,7—0,9 остатка тирозина и окислению двух SH-групп; активность апофермента, определяемая после добавления избытка пиридоксальфосфата, снижается при этом на 35—50%. Инкубация нитрованного апофермента с дитиотреитолом (200-кратный молярный избыток, 2 ч) не приводит к увеличению ферментативной активности, хотя при этом происходит восстановление одной из двух окисленных SH-групп.

После добавления насыщающего избытка пиридоксальфосфата (20 экв) к нитрованному апоферменту в полосе поглощения связанного кофермента ($\lambda_{\text{макс}}$ 360 нм) в спектре КД появляется эффект Коттона, который лишь слегка (на 15%) меньше эффекта, наблюдаемого при реконструкции нативного апофермента (рис. 3). Спектры КД нитрованного апофермента в полосах поглощения ароматических аминокислот (300—260 нм), измеренные до и после добавления пиридоксальфосфата, незначительно отличаются от соответствующих спектров нативного апофермента (см. рис. 3). Эти небольшие отличия могут быть обусловлены конформационными изменениями, возникающими при модификации остатков аминокислот, расположенных вне активного центра. Модификация остатка тирозина, расположенного в активном центре и участвующего в связывании пиридоксальфосфата, должна была быть, по нашему мнению, приводить к более резким изменениям в спектрах КД в полосе поглощения связанного кофермента. Полученные данные отличаются от данных Турано и соавт. [8], которые нашли, что нитрование аспарат-апотрансаминазы из сердца свиньи приводит к почти полной утрате способности соединяться с коферментом. В целом результаты наших опытов не дают указаний на наличие существенного ос-

Рис. 3. Спектры КД нативной и нитрованной апотрансаминазы до и после добавления пиридоксальфосфата (концентрация белка — 0,4 мг/мл): 1 — нативный апофермент; 2 — то же + 20 экв пиридоксальфосфата (инкубация 1 ч, 22°); 3 — апофермент, обработанный 60-кратным избытком $C(NO_2)_4$ при pH 8,0 (содержит 0,74 остатка нитротирозина); 4 — то же + 20 экв пиридоксальфосфата (инкубация 1 ч, 22°).
Условия см. подпись к рис. 2



татка тирозина в цитоплазматической аспартат-трансаминазе кур. Это заставляет отнестись весьма сдержанно к предположению некоторых авторов [7, 8] о важной роли фенольной группы тирозина в активном центре аспартат-трансаминазы.

Экспериментальная часть

Аспартат-трансаминазу выделяли из цитозоля куриных сердец и очищали до гомогенного состояния по методике Кочкиной и Торчинского [10]. Концентрацию фермента определяли спектрофотометрически, принимая D_{280} 1%-ного раствора равной 14,2 [11]. Активность фермента определяли методом Дженкинса и соавт. [12]. Апофермент получали путем добавления 5-кратного избытка цистенинсульфината к раствору трансаминазы при pH 7,5, пропускания смеси через колонку с сефадексом G-25 и последующего диализа вначале против 0,5 М, затем против 0,25 М К-фосфатного буфера, pH 5,5 (18 ч, 4°). Остаточная активность апофермента составляла 2—5%, степень реактивации при добавлении пиридоксальфосфата — 96—100%.

Содержание SH-группы в ферменте определяли при помощи 5,5'-дитио-бис(2-нитробензоата) при pH 8 как описано в работе [10]. С указанным реагентом в нативном ферменте реагирует одна SH-группа, а в присутствии 0,5% додецилсульфата натрия — четыре SH-группы. Число окисленных SH-групп вычисляли по разности между данными определения SH-групп в ферменте до и после обработки $C(NO_2)_4$.

Нитрование трансаминазы проводили при 20° путем добавления от 1 до 5 мкл 0,65 М раствора $C(NO_2)_4$ в этаноле к раствору белка в 0,05 М трис-HCl-буфере (pH 8,0). Реакцию прекращали пропусканием смеси через колонку с сефадексом G-25. Содержание нитротирозина в белке определяли спектрофотометрически при pH 8,5, принимая ϵ_{428} равным $4100 M^{-1}$ [2]. Число SH-групп и остатков нитротирозина рассчитывали на субъединицу фермента с M 50 000 [11]. $C(NO_2)_4$ очищали путем перегонки в вакууме.

Спектры КД измеряли на дихрографе «Jouan», тип III фирмы «Jobin Yvon» (Франция) в кювете толщиной 1 см при чувствительности $1 \cdot 10^{-6}$ единицы экстинкции на 1 мм диаграммы.

Авторы выражают искреннюю благодарность А. Е. Браунштейну за интерес к работе и ценные замечания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Braunstein A. E. (1973) in «The Enzymes» (Ed. by P. Boyer) vol. 9, pp. 379—481, Academ. Press, N. Y., London.
2. Sokolovsky M., Riordan J. F., Vallee B. L. (1966) *Biochemistry*, 5, 3582—3589.
3. Riordan J. F., Christen P. (1968) *Biochemistry*, 7, 1525—1530.
4. Демидкина Т. В., Бочаров А. Л., Поляновский О. Л., Карпейский М. Я. (1973) Молекулярн. биология, 7, 461—471.
5. Birchmeier W., Zaoralak P. E., Christen P. (1973) *Biochemistry*, 12, 2874—2879.
6. Okamoto M., Morino Y. (1973) *J. Biol. Chem.*, 248, 82—90.
7. Ivanov V. I., Karpeisky M. Ya. (1969) *Advances Enzymol.*, 32, 21—53.

8. Turano C., Barra D., Bossa F., Ferraro A., Giartosio A. (1971) *Eur. J. Biochem.*, **23**, 349—354.
9. Kochkina V. M., Torchinskii Yu. M. (1975) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **63**, 392—399.
10. Кочкина В. М., Торчинский Ю. М. (1975) *Биохимия*, **40**, 812—818
11. Bertland L. H., Kaplan N. O. (1968) *Biochemistry*, **7**, 134—142.
12. Jenkins W. T., Yphantis D. A., Sizer I. W. (1959) *J. Biol. Chem.*, **234**, 51—57.

Поступила в редакцию
30.V.1975

MODIFICATION OF CHICKEN HEART ASPARTATE TRANSAMINASE WITH TETRANITROMETHANE

KOCHKINA V. M., VOLKOVA G. A., TORCHINSKII Yu. M.

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

Tyrosine and cysteine residues in aspartate transaminase from chicken heart cytosol have been modified with tetranitromethane, $C(NO_2)_4$. The number of modified residues depended on molar excess of $C(NO_2)_4$, pH, incubation time, and on the presence of substrates. $C(NO_2)_4$ readily oxidizes one (exposed) SH group of the enzyme. The second (semi-buried) SH group is oxidized slowly only in the presence of the large excess of $C(NO_2)_4$. Treatment of the holoenzyme with a 60-fold excess of $C(NO_2)_4$ at pH 8 in the absence of substrates leads to nitration of a maximum of 0.8 tyrosine residue per subunit; in the presence of the substrate pair, glutamate and ketoglutarate, 1.65 eq of nitrotyrosine is formed. Upon nitration in the absence or presence of substrates, enzyme activity was lowered to 87%, resp. 65% of the initial value. Treatment of the apoenzyme with $C(NO_2)_4$ in a 60-fold excess leads to nitration of 0.7—0.9 tyrosine residue, oxidation of two SH groups and 35—50% inactivation. The nitrated apoenzyme retains to a considerable degree the capacity to bind pyridoxal phosphate.
