



УДК 577.152.141*3'134:577.112.4

ИДЕНТИФИКАЦИЯ АМИНОКИСЛОТНОГО ОСТАТКА
ГЛУТАМАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ, МОДИФИЦИРУЕМОГО
2,2,6,6-ТЕТРАМЕТИЛ-4-ОКСОПИПЕРИДИН-1-ОКСИЛОМ.
ИЗУЧЕНИЕ ХАРАКТЕРА ИНАКТИВАЦИИ КАТАЛИТИЧЕСКИ
АКТИВНОГО ОЛИГОМЕРА ФЕРМЕНТА ПРИ МОДИФИКАЦИИ

Агаджанян С. А., Арутюнян А. А., Карабабян Л. В.

Институт экспериментальной биологии Академии наук АрмССР, Ереван

Показано, что иминоксильный радикал — 2,2,6,6-тетраметил-4-оксопиперидин-1-оксиль селективно блокирует ϵ -аминогруппу остатка Lys-126 глутаматдегидрогеназы (L-глутамат NAD(P)-оксидоредуктазы, КФ 1.4.1.3) печени крупного рогатого скота. Блокирование ϵ -аминогруппы остатка Lys-126 одного из протомеров каталитически активного гексамера приводит к потере около половины ферментативной активности. Сопутствующая модификации инактивация фермента носит кооперативный характер.

Каталитически активная единица глутаматдегидрогеназы представляет собой гексамер, состоящий из протомеров с идентичной аминокислотной последовательностью [1, 2]. Каждый из этих протомеров содержит 33 остатка лизина [2]. Два из них, остатки Lys-27 и Lys-126, локализованы в области активного центра фермента. Остаток Lys-27 модифицируется глиоксалем и, по-видимому, принимает участие в связывании субстрата [3, 4]. Остаток Lys-126 модифицируется целым рядом реагентов: N(N'-ацетил-4-сульфамойлфенил)малеимидом [5], цианатом [6], 4-иодацетамидосалицилатом [7], L-глутамил- α -хлорметилкетонном [8], пиридоксальфосфатом [9–14]. Поскольку модификация остатка Lys-126 сопровождается полной инактивацией фермента, предполагается, что этот остаток принимает участие либо в связывании субстратов, либо непосредственно в катализе [14].

Ранее [15, 16] было показано, что ТМРО образует восстанавливаемое борогидридтом натрия основание Шиффа с одним из лизиновых остатков, который расположен в области активного центра глутаматдегидрогеназы. При этом было отмечено, что глутаматдегидрогеназа, модифицированная ТМРО, по ряду свойств близка к глутаматдегидрогеназе, модифицированной пиридоксальфосфатом [16].

Цель настоящего сообщения заключается в идентификации аминокислотного остатка глутаматдегидрогеназы, модифицируемого ТМРО, и изучении характера инактивации фермента вследствие его модификации.

Для получения в индивидуальном виде пептидов, содержащих модифицированные спиновой меткой аминокислотные остатки, кислоторастворимую фракцию протеолитического гидролизата (ТМРО)-глутаматдегидрогеназы подвергали гель-хроматографии на колонке с сефадексом G-25 «superfine». Как видно из рис. 1, практически весь пептидный материал, содержащий остаток ТМРО, элюируется с колонки единственным пиком. Фракции, обладающие сигналом ЭПР (на рисунке выделены), объединяли и после упаривания подвергали высоковольтному препаративному электрофорезу на бумаге при pH 5,5. Зону электрофореграммы, обладающую не менее 95% интенсивности сигнала ЭПР нанесенного об-

Принятые сокращения: ТМРО — 2,2,6,6-тетраметил-4-оксопиперидин-1-оксиль; (ТМРО)-глутаматдегидрогеназа — глутаматдегидрогеназа, модифицированная ТМРО; (P-Рху)-глутаматдегидрогеназа — глутаматдегидрогеназа, модифицированная пиридоксальфосфатом; (P-Рху, ТМРО)-глутаматдегидрогеназа — (ТМРО)-глутаматдегидрогеназа, модифицированная пиридоксальфосфатом.

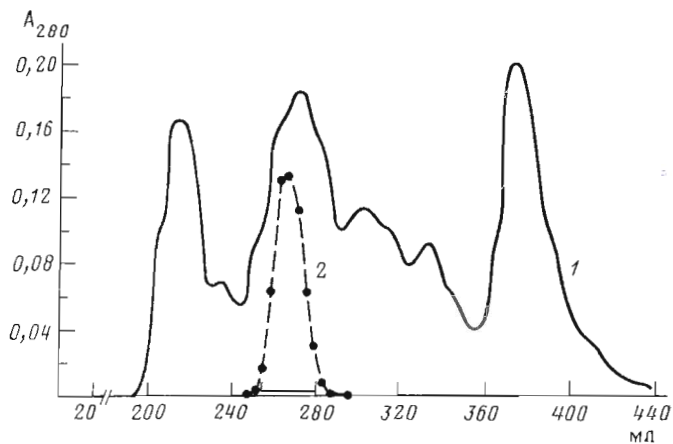


Рис. 1. Гель-хроматография протеолитического гидролизата (ТМРО)-глутаматдегидрогеназы на колонке с сефадексом G-25. 1 — поглощение, 2 — относительная интенсивность сигнала ЭПР

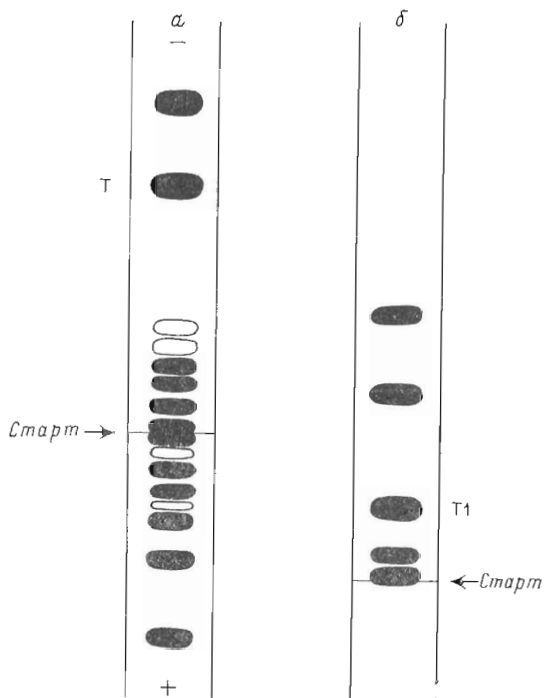


Рис. 2. Очистка фракций гидролизата (ТМРО)-глутаматдегидрогеназы, обладающих сигналом ЭПР (256–280 мл, рис. 1), высоковольтным электрофорезом на бумаге (а) и далее зоны Т хроматографией на бумаге (б). Т1 — пептидное пятно, обладающее сигналом ЭПР. Светлыми пятнами обозначены минорные пептидные компоненты

разца (Т, рис. 2а), элюировали с бумаги и очищали хроматографией на бумаге. Таким образом, из гидролизата (ТМРО)-глутаматдегидрогеназы был выделен единственный пептид (Т1, рис. 2б), содержащий аминокислотный остаток, модифицированный спиновой меткой. Для пептида определен аминокислотный состав (по отношению к Val): Val — 1,0, Ala — 2,1, Gly — 2,7, Lys — 1,2 и спин-меченое производное Lys. Аминокислотная последовательность N-концевого фрагмента и аминокислотный состав этого пептида — Gly-Gly-Ala-(Lys*, Ala, Gly, Val, Lys) — позволяют иден-

* Спин-меченое производное Lys.

тифицировать его как фрагмент 123—130 первичной структуры глутаматдегидрогеназы печени быка: Gly-Gly-Ala-Lys-Ala-Gly-Val-Lys- [2]. Поскольку кислоторастворимая фракция триптического гидролизата (ТМРО)-глутаматдегидрогеназы содержала 90—95% спиновой метки (см. «Экспериментальную часть»), следует заключить, что ТМРО селективно блокирует ϵ -аминогруппу остатка Lys-126.

Данные по изучению влияния модификации остатка Lys-126 *L*-глутамил- α -хлорметилкетонем [8] и пиридоксальфосфатом [13] на ферментативную активность глутаматдегидрогеназы свидетельствуют о том, что инактивация, сопутствующая модификации, является нелинейной функцией количества модифицированных протомеров каталитически активного гексамера. Так, модификация лишь одного из шести протомеров этими реагентами приводит к потере около половины ферментативной активности. Для выяснения характера инактивации глутаматдегидрогеназы, в результате блокирования ϵ -аминогруппы остатка Lys-126 ТМРО, была оценена мольная доля спиновой метки в образцах (ТМРО)-глутаматдегидрогеназ, обладающих 54 и 30% остаточной активности соответственно. Согласно полученным данным, каждый моль протомеров данных производных фермента содержит соответственно 0,16—0,18 и 0,32—0,38 моль остатка ТМРО. Иначе говоря, модификация в среднем одного протомера приводит к потере половины активности гексамера глутаматдегидрогеназы, а 70% инактивация достигается при модификации в среднем около двух протомеров. Поскольку этот эффект, который классифицируется как эффект отрицательной кооперативности, вызывают такие различные по структуре соединения, как ТМРО, *L*-глутамил- α -хлорметилкетон и пиридоксальфосфат, можно предположить, что он скорее всего является следствием блокирования ϵ -аминогруппы остатка Lys-126 и не связан с взаимодействием остатка модифицирующего реагента с белковой глобулой.

Свидетельство о нелинейном характере инактивации глутаматдегидрогеназы было получено и ранее [16] при сравнении интенсивностей флуоресценции фосфопиридоксильных остатков (*P*-Рху, ТМРО)- и (*P*-Рху)-глутаматдегидрогеназ. Эти производные были получены в аналогичных условиях путем модификации пиридоксальфосфатом (ТМРО)-глутаматдегидрогеназы, обладающей 30% остаточной активности, и нативной глутаматдегидрогеназы соответственно. Ввиду незначительного различия интенсивностей флуоресценции было ошибочно допущено, что пиридоксальфосфат и ТМРО не конкурируют за центр связывания и взаимодействуют с различными лизиновыми остатками глутаматдегидрогеназы. Однако, учитывая результаты настоящей работы о селективной модификации остатка Lys-126 со стороны ТМРО, данные о незначительном различии интенсивностей флуоресценции [16] могут быть интерпретированы как следствие кооперативной инактивации фермента. Принимая во внимание, что каждый моль протомеров (ТМРО)-глутаматдегидрогеназы, обладающей 30% остаточной активности, содержит 0,32—0,38 моль остатка ТМРО, мы провели оценку ожидаемого значения отношения флуоресценции фосфопиридоксильных остатков (*P*-Рху, ТМРО)- и (*P*-Рху)-глутаматдегидрогеназ. Учитывая, что пиридоксальфосфат кроме остатка Lys-126 модифицирует также остаток Lys-333 [13], ожидаемое значение отношения флуоресценций должно быть 0,81—0,84. Полученное нами экспериментальное значение отношения флуоресценций составляет 0,85, что хорошо согласуется с ожидаемой величиной этого отношения при учете нелинейного характера инактивации гексамеров глутаматдегидрогеназы в результате блокирования ϵ -аминогруппы остатка Lys-126.

Следует заметить, что полученные результаты, несмотря на удовлетворительное согласие с данными по инактивации глутаматдегидрогеназы *L*-глутамил- α -хлорметилкетонем [8] и пиридоксальфосфатом [13], противоречат данным [15], согласно которым инактивация фермента при модификации ТМРО является линейной функцией мольной доли спиновой метки в модифицированном белке. Причины несоответствия этих результатов вряд ли могут быть определены однозначно на основе имею-

Очистка глутаматдегидрогеназы из печени быка

Стадии очистки	Объем, мл	Концентрация белка, мг/мл	Удельная активность, ед./мг	Степень очистки	Выход по активности, %
Надосадочная фракция гомогената (100 000g)	800	37,5	0,29	1	100
Осаждение 30% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	800	6,5	1,45	5	87
Осаждение 50% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	100	18,0	3,63	12,5	75
Хроматография на DEAE-сефадексе А-50	180	2,4	11,9	41	60
Хроматография на GTP-сефарозе 4В	200	0,55	38,0	131	48

щихся в настоящее время экспериментальных данных. Однако, поскольку эти противоречащие результаты получены в близких экспериментальных условиях, можно допустить, что они обусловлены тонкими различиями использованных образцов глутаматдегидрогеназ. Весьма вероятно, что при определенных условиях имеет место нарушение связей между активными центрами гексамера глутаматдегидрогеназы, не затрагивающее сами центры. В таком случае может наблюдаться исчезновение кооперативных эффектов и поведение олигомерного фермента должно описываться моделью с не взаимодействующими активными центрами.

Экспериментальная часть

В работе использованы NADH, α -кетоглутаровая кислота, GTP, пиридоксальфосфат, дитиотреит, γ -метилловый эфир *L*-глутаминовой кислоты, дансилхлорид (Sigma, США), TMO (Reanal, Венгрия), NaNH_2 , дважды кристаллизованный трипсин, трижды кристаллизованный химо-трипсин (Koch-Light Laboratories Ltd, Англия), полиамидные пленки (Schleicher und Schüll, ФРГ).

Глутаматдегидрогеназу из печени крупного рогатого скота получали следующим методом: 150 г печени гомогенизировали в двукратном объеме 0,1 М калий-фосфатного буфера, pH 7,2, гомогенизатором типа «Полиэлектрон». Объем гомогената довели до 900 мл, используя тот же буфер, и центрифугировали при 100 000g. Далее для очистки фермента использовали методы фракционирования сульфатом аммония и ионообменной хроматографии на колонке с DEAE-сефадексом А-50 (4×40 см), уравновешенным 0,01 М калий-фосфатным буфером, pH 7,2. Элюцию фермента проводили, используя линейный градиент 0,12—0,25 М KCl в том же буфере. Характеристики фермента после каждого этапа очистки приведены в таблице. Для дальнейшей очистки глутаматдегидрогеназы использовали метод аффинной хроматографии на колонке сефарозы 4В, модифицированной GTP (2,5×3 см). Сефарозу 4В модифицировали согласно методу, описанному ранее [17]. Фермент элюировали KCl (градиент 0,01—0,40 М) в 0,01 М калий-фосфатном буфере, pH 7,2. Удельная активность полученного образца глутаматдегидрогеназы составляла 38 ед/мг белка, что практически совпадает с удельной активностью гомогенного препарата глутаматдегидрогеназы (40 ед/мг белка) [17].

(TMO)-глутаматдегидрогеназа. 30 мг глутаматдегидрогеназы в 3 мл 0,1 М калий-фосфатного буфера, pH 8,0, смешивали с 3 мл 0,3 М TMO в том же буфере и инкубировали 30 мин при 20° С. Затем в реакционную смесь добавляли 10-кратный по отношению к TMO мольный избыток NaNH_2 . Эту и последующие процедуры проводили при 4° С. Через 15 мин объем довели до 60 мл добавлением 0,2 М калий-фосфатного буфера, pH 6,0, и раствор концентрировали на аппарате «Amicon», используя мембрану РМ-30, до конечного объема 3 мл. Остатки непрореагировавших низкомолекулярных компонентов реакции удаляли гель-хроматографией на колонке с сефадексом G-25 (2,5×40 см), уравновешенным 0,1 М калий-фосфатным буфером, pH 7,8. Элюцию

проводили тем же буфером. Полученный образец фермента обладал 30% остаточной активностью и характерным для (ТМРО)-глутаматдегидрогеназы сигналом ЭПР [16]. Для получения образца (ТМРО)-глутаматдегидрогеназы, обладающей 54% остаточной активностью, концентрация ТМРО при инкубации с ферментом составляла 0,08 М.

(*P*-Рху)-глутаматдегидрогеназу получали следующим методом: 10 мг глутаматдегидрогеназы растворяли в 2 мл 0,5 мМ раствора пиридоксальфосфата в 0,1 М калий-фосфатном буфере, рН 7,5, и инкубировали 60 мин при 20° С без доступа света. Затем в реакционную смесь добавляли небольшими порциями NaBH₄ до исчезновения желтой окраски. Далее для удаления низкомолекулярных компонентов реакции использовали процедуры, описанные при получении (ТМРО)-глутаматдегидрогеназы. Полученный образец обладал 7% остаточной активностью и содержал 2,1 моль фосфопиридоксильного остатка в расчете на 1 моль протомеров глутаматдегидрогеназы (M_r 55 393 [2]).

В тех же условиях проводили модификацию (ТМРО)-глутаматдегидрогеназы пиридоксальфосфатом. Полученный образец (*P*-Рху, ТМРО)-глутаматдегидрогеназы обладал 5% остаточной активностью и содержал 1,74 моль фосфопиридоксильного остатка в расчете на 1 моль протомеров фермента.

Протеолизический гидролиз (ТМРО)-глутаматдегидрогеназы. Смесь, содержащую 20 мг (ТМРО)-глутаматдегидрогеназы и трипсина (соотношение трипсин — белок 1 : 35), инкубировали при 37° С в 20 мл 0,1 М калий-фосфатного буфера, рН 7,5, содержащего 1 мМ дитиотреит. Для контроля выхода в кислоторастворимую фракцию гидролизата пептидов, включающих в себя остаток ТМРО, через каждые 30 мин из инкубационной смеси отбирали пробы по 0,3 мл. После титрования отобранных проб до рН 2,0 разбавленной хлорной кислотой осадок удаляли центрифугированием, рН кислоторастворимой фракции доводили 0,1 М КОН до 7,5 и оценивали в ней относительное содержание остатка ТМРО, измеряя интенсивность сигнала ЭПР при температуре жидкого азота. Через 60 мин инкубации, когда кислоторастворимая фракция гидролизата содержала 50—60% общего количества спиновой метки (ТМРО)-глутаматдегидрогеназы, в инкубационную смесь добавляли новую порцию трипсина в соотношении трипсин — белок 1 : 20 по отношению к начальному количеству белка. По достижении 90—95% содержания остатка ТМРО в кислоторастворимой фракции гидролизата (через 90 мин после начала инкубации) триптический гидролиз останавливали, понизив рН инкубационной смеси до 2,0 добавлением хлорной кислоты. Нерастворимые компоненты удаляли центрифугированием, а надосадочную фракцию титровали 0,1 М КОН до рН 7,5. Образовавшуюся при этом нерастворимую соль (KClO₄) удаляли центрифугированием. Для дальнейшего гидролиза пептидного материала к полученному гидролизату добавляли химотрипсин (соотношение химотрипсин — белок 1 : 100 в расчете к первоначальному количеству белка) и инкубировали 15 ч при 20° С. Полученный гидролизат после упаривания на роторном испарителе растворяли в 4 мл 0,1 М аммоний-бикарбонатного буфера, рН 8,3, наносили на колонку (2,5×120 см) с сефадексом G-25, «superfine», уравновешенным тем же буфером, собирали фракции по 4 мл (рис. 1).

Концентрацию белков определяли спекрофотометрически, принимая коэффициент поглощения для (ТМРО)-глутаматдегидрогеназы равным коэффициенту поглощения глутаматдегидрогеназы $E_{230}^{1\%} 0,97$ (см·мг/мл)⁻¹ [18], для (*P*-Рху, ТМРО)-глутаматдегидрогеназы — равным коэффициенту поглощения (*P*-Рху)-глутаматдегидрогеназы $E_{230}^{1\%} 1,25$ (см·мг/мл)⁻¹ при рН 7,5 [12]. Молярное содержание фосфопиридоксильного остатка в модифицированных производных глутаматдегидрогеназы определяли, используя молярный коэффициент поглощения $\epsilon_{325} 9700$ М⁻¹·см⁻¹, при рН 7,0 [9].

Активность глутаматдегидрогеназы определяли согласно методу, описанному ранее [16]. Интенсивности флуоресценции фосфопиридок-

сильных производных глутаматдегидрогеназы измеряли при 410 нм (возбуждение при 325 нм) на спектрофлуориметре Perkin — Elmer (США).

Спектры ЭПР снимали на радиоспектрометре Varian E-9 (США) в стандартной кварцевой кювете E-248. Мощность СВЧ-поля 20 мВт, амплитуда модуляции 2 Э. В зависимости от поставленной задачи количество спиновой метки определяли методом двойного интегрирования спектра ЭПР с предварительным накоплением сигнала с помощью компьютера Hewlett Packard, используя стандартную программу E-900, либо по интенсивности сигнала ЭПР при температуре 77 К в условиях, описанных ранее [16].

Высоковольтный препаративный электрофорез пептидов проводили в течение 50 мин на бумаге Whatman 3ММ длиной 50 см, используя пипридин-ацетатный буфер, рН 5,5, при 60 В/см, хроматографию на бумаге — в системе растворителей *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (3:3:1).

Аминокислотный состав определяли дансильным методом [19], N-концевую последовательность аминокислот — дансильным вариантом метода Эдмана [20]. Интенсивности флуоресценции пятен Dns-аминокислот измеряли на спектрофлуориметре Farrand Optical Co. Inc. (США), оборудованном сканирующей приставкой.

Авторы выражают благодарность сотруднице лаборатории физико-химических исследований Института экспериментальной кардиологии ВКНЦ АМН СССР Н. В. Медведевой за помощь в съемке и обработке спектров ЭПР.

ЛИТЕРАТУРА

1. Reisler E., Pouyet J., Eisenberg H. *Biochemistry*, 1970, v. 9, № 15, p. 3095—3102.
2. Moon K., Smith E. L. *J. Biol. Chem.*, 1973, v. 248, № 9, p. 3082—3088.
3. Deppert W., Hucho F., Sund H. *Eur. J. Biochem.*, 1973, v. 32, № 1, p. 76—82.
4. Rasched I., Jörnvall H., Sund H. *Eur. J. Biochem.*, 1974, v. 41, № 3, p. 603—606.
5. Holbrook J. J., Jackel R. *Biochem. J.*, 1969, v. 111, № 5, p. 689—694.
6. Veronese F. M., Piszkiwicz D., Smith E. L. *J. Biol. Chem.*, 1972, v. 247, № 3, p. 754—759.
7. Holbrook J. J., Roberts P. A., Wallis R. B. *Biochem. J.*, 1973, v. 133, № 4, p. 165—171.
8. Rasool Ch. G., Nicolaidis S., Akhtar M. *Biochem. J.*, 1976, v. 157, № 3, p. 675—686.
9. Anderson B. M., Anderson C. D., Churchich J. E. *Biochemistry*, 1966, v. 5, № 9, p. 2893—2900.
10. Piszkiwicz D., Landon M., Smith E. L. *J. Biol. Chem.*, 1970, v. 245, № 10, p. 2622—2626.
11. Goldin B. R., Frieden C. *J. Biol. Chem.*, 1972, v. 247, № 7, p. 2139—2144.
12. Brown A., Culver J. M., Fisher H. F. *Biochemistry*, 1973, v. 12, № 22, p. 4367—4373.
13. Talbot J.-C., Gros C., Cosson M.-P., Pantaloni D. *Biochim. et biophys. acta*, 1977, v. 494, № 1, p. 19—32.
14. Chen S.-S., Engel P. C. *Biochem. J.*, 1975, v. 147, № 2, p. 351—358.
15. Andree P. J., Zantema A. *Biochemistry*, 1978, v. 17, № 5, p. 778—783.
16. Агаджанян С. А., Погосян А. А., Карабашян Л. В. *Молекулярн. биология*, 1982, т. 16, № 2, с. 345—351.
17. McCarthy A.-D., Walker J. M., Tipton K. F. *Biochem. J.*, 1980, v. 191, № 2, p. 605—611.
18. Olson J. A., Anfinsen C. B. *J. Biol. Chem.*, 1952, v. 197, № 1, p. 67—79.
19. Арутюнян А. А., Северин Е. С., Варшавский Я. М. *Биохимия*, 1975, т. 40, № 4, с. 878—884.
20. Gray W. R., Hartley B. S. *Biochem. J.*, 1963, v. 89, № 1, p. 59.

Поступила в редакцию
22.XII.1983

IDENTIFICATION OF AMINO ACID RESIDUE MODIFIED
BY 2,2,6,6-TETRAMETHYL-4-OXO-PIPERIDINE-1-OXYL
IN GLUTAMATE DEHYDROGENASE. INVESTIGATION OF THE INACTIVATION
CHARACTER OF CATALYTICALLY ACTIVE OLIGOMER DURING MODIFICATION
AGADZHANYAN S. A., ARUTUNYAN A. A., KARABASHYAN L. V.
*Institute of Experimental Biology, Academy of Sciences
of the Armenian SSR, Yerevan*

It has been shown that 2,2,6,6-tetramethyl-4-oxo-piperidine-1-oxyl selectively blocks ϵ -amino group of Lys¹²⁶ residue in bovine liver glutamate dehydrogenase (*L*-glutamate NAD(P) oxydoreductase, EC 1.4.1.3). Modification of this residue in one of the six protomers of catalytically active hexamer is accompanied by the loss of about half of the enzymatic activity. The enzyme inactivation caused by modification has a cooperative character.