



УДК 577.152.141 \*134:577.112.4

**ИММОБИЛИЗАЦИЯ ГЛУТАМАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ  
НА СЕФАРОЗЕ-4В, МОДИФИЦИРОВАННОЙ ПИРИДОКСАЛЬ-5'-  
ФОСФАТОМ. ИЗУЧЕНИЕ ДИССОЦИИИ ГЕКСАМЕРА  
ПОД ДЕЙСТВИЕМ ГУАНИДИНГИДРОХЛОРИДА**

**Аветисян С. Г., Агаджанян С. А., Казарян Р. А.,  
Карабабян Л. В.**

*Институт экспериментальной биологии Академии наук АрмССР, Ереван*

Разработан метод иммобилизации глутаматдегидрогеназы на сефарозе-4В, модифицированной пиридоксаль-5'-фосфатом, путем вовлечения в ковалентную связь с носителем одной из субъединиц гексамера фермента. Показано, что в области концентраций, предшествующих денатурации, гуанидингидрохлорид не вызывает диссоциации гексамерной формы фермента до более низкомолекулярных образований. Денатурация иммобилизованной глутаматдегидрогеназы под влиянием гуанидингидрохлорида происходит через стадию диссоциации гексамеров до мономеров.

В связи с выявлением возможных механизмов функционирования и регуляции каталитической активности олигомерных ферментов важное значение имеют исследования их четвертичной структуры и способов упаковки субъединиц, составляющих каталитически активный олигомер.

Каталитически активная глутаматдегидрогеназа печени крупного рогатого скота (*L*-глутамат-NAD(P)-оксидоредуктаза, КФ 1.4.1.3) представляет собой гексамер, состоящий из идентичных по аминокислотной последовательности протомеров [1, 2]. Согласно данным Таширо и соавт. [3], полученным методом светорассеяния и кругового дихроизма, гуанидингидрохлорид в области концентраций 0,6–1,0 М индуцирует обратимую диссоциацию гексамерной формы фермента до тримеров, которые сохраняют четвертичную структуру вплоть до 2 М концентрации гуанидингидрохлорида. Дальнейшее повышение концентрации денатурирующего агента (до 2,8 М) приводит к диссоциации тримеров до мономеров с их последующей денатурацией до развернутых цепей. Напротив, в работе Сугробовой и соавт. [4] на основании седиментационных исследований было показано, что денатурация глутаматдегидрогеназы протекает через единственную стадию диссоциации гексамеров до мономеров в интервале концентраций гуанидингидрохлорида 2–3 М. Иначе говоря, согласно данным работы [3], гексамер глутаматдегидрогеназы организован как «димер тримеров», а по данным работы [4] — как «гексамер мономеров».

Для выяснения вопросов структурной организации олигомерных ферментов в последнее время весьма успешно применяется их иммобилизация на нерастворимых носителях. Так, изучая характер диссоциации тетрамеров иммобилизованной аргиназы под влиянием *n*-оксимеркурибензоата, Карвайл и др. [5] показали, что аргиназа организована как «димер димеров». Сходная структурная организация была продемонстрирована для тетрамеров глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы [6–8].

Баттл и соавт. [9], используя иммобилизованную форму октамерного фермента — аминолевулинатдегидратазы, показали, что под влиянием 3 М мочевины фермент диссоциирует на два тетрамера, которые при обработке 6 М мочевиной диссоциировали до димеров.

В настоящем сообщении предпринята попытка иммобилизовать глутаматдегидрогеназу на сефарозе-4В и исследовать характер диссоциации

Сокращения: PLP — пиридоксаль-5'-фосфат, EDC — 1-этил-3-(3'-диметиламинопропил)карбодимид.

и денатурации каталитически активного гексамера фермента, с тем чтобы получить информацию о его структурной организации.

Обязательной предпосылкой корректного решения поставленной задачи является ковалентная иммобилизация олигомерного фермента посредством вовлечения в химическую связь лишь одного из его протомеров. При использовании в качестве носителя BrCN-активированной сефарозы условия, обеспечивающие связывание тетрамера глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы через одну субъединицу, подбирали эмпирически, варьируя степень активации геля BrCN [10]. Другой подход, позволяющий осуществлять контролируемую иммобилизацию олигомерных ферментов, — использование в качестве агентов, связывающих белок с носителем, соединений, специфически взаимодействующих с ферментом. Так, Икеда и Фукуи [11] описали иммобилизацию триптофаназы (тетрамерного фермента) через одну субъединицу, используя в качестве носителя сефарозу, модифицированную пиридоксаль-5'-фосфатом. Иммобилизация фермента осуществлялась благодаря образованию основания Шиффа между альдегидной группой остатка пиридоксаль-5'-фосфата и аминогруппой активного центра фермента.

В настоящее время известно, что каждый протомер глутаматдегидрогеназы содержит два лизиновых остатка, способных к образованию Шиффа с пиридоксаль-5'-фосфатом при значениях pH 8,0 [12]. Один из этих остатков (Lys<sup>123</sup>) расположен в зоне активного центра, и его модификация сопровождается инактивацией фермента. При модификации фермента в присутствии кофермента и субстрата (NADPH и  $\alpha$ -кетоглутарат) в насыщающих концентрациях фермент полностью сохраняет каталитическую активность и модификации подвергается лишь остаток Lys<sup>333</sup>. При этом гексамер фермента теряет способность к образованию высокомолекулярных ассоциатов [12]. Варьирование условий, ограничивающих уровень модификации глутаматдегидрогеназы пиридоксаль-5'-фосфатом, дает возможность контролировать процесс иммобилизации фермента на сефарозе, модифицированной пиридоксаль-5'-фосфатом.

Пиридоксаль-5'-фосфат пришивали к сефарозе с помощью реакции образования фосфамидной связи между свободной аминогруппой  $\omega$ -аминогексильного производного сефарозы-4В и фосфатной группой пиридок-

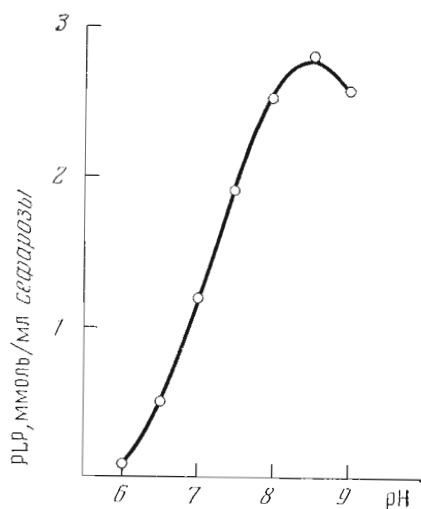


Рис. 1

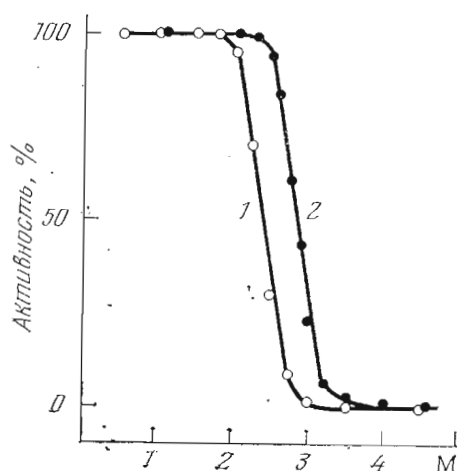


Рис. 2

Рис. 1. Зависимость конденсации PLP с аминоксильной производной сефарозы-4В под действием EDC от pH. Длительность реакции 4 ч, [PLP] — 40 мМ

Рис. 2. Зависимость активности нативной (1) и иммобилизованной (2) глутаматдегидрогеназы от концентрации гуанидингидрохлорида при инкубации образцов ферментов в средах, содержащих гуанидингидрохлорид. Продолжительность инкубации 30 мин, температура 25° С

Таблица 1

Некоторые свойства глутаматдегидрогеназы, иммобилизованной на PLP-сефарозе в присутствии различных лигандов

| Концентрации лигандов при иммобилизации, мМ |      |     |                        | Количество глутаматдегидрогеназы на 1 мл набухшего геля, мг | Активность иммобилизованного фермента *, % | Количество субъединиц, вовлеченных в ковалентную связь с сефарозой |
|---------------------------------------------|------|-----|------------------------|-------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| NADPH                                       | NADH | GTP | $\alpha$ -кетоглутарат |                                                             |                                            |                                                                    |
| —                                           | —    | —   | —                      | 3,2                                                         | 15–20                                      | 3,9–4,2                                                            |
| 1                                           | —    | —   | 100                    | 3,1                                                         | 40–45                                      | 3,4–3,8                                                            |
| —                                           | 2    | 0,5 | 100                    | 0,2                                                         | 75–80                                      | 0,9–1,2                                                            |
| —                                           | 2    | 0,2 | 100                    | 0,5                                                         | 45–50                                      | 2,2–2,5                                                            |

\* Рассчитана по отношению к активности растворимого фермента.

Таблица 2

Некоторые характеристики растворимой глутаматдегидрогеназы, модифицированной пиридоксаль-5'-фосфатом в присутствии различных лигандов

| Концентрация лигандов при модификации, мМ |      |     |                        | PLP, моль/моль протомера | Активность, % * |
|-------------------------------------------|------|-----|------------------------|--------------------------|-----------------|
| NADPH                                     | NADH | GTP | $\alpha$ -кетоглутарат |                          |                 |
| —                                         | —    | —   | —                      | 1,9                      | 9               |
| 1                                         | —    | —   | 100                    | 0,9                      | 100             |
| —                                         | 2    | 0,2 | 100                    | 0,6–0,7                  | 100             |
| —                                         | 2    | 0,5 | 100                    | 0,4                      | 100             |

\* Рассчитана по отношению к активности нативного фермента.

саль-5'-фосфата. Для этого использовали метод, аналогичный методу, разработанному Готтих и соавт. [13], для получения фосфамидов нуклеотидов в водной среде, заключающийся в конденсации фосфатной группы с аминогруппой в присутствии EDC. Согласно этому методу, наиболее эффективная конденсация наблюдается при pH, на единицу меньшем  $pK_a$  амина. Однако при значениях pH, близких к  $pK_a$  амина, возможно интенсивное образование основания Шиффа между аминогруппой и альдегидной группой пиридоксаль-5'-фосфата. Учитывая это обстоятельство, для выяснения оптимальных условий реакции нами была изучена pH-зависимость реакции образования фосфамида между  $\omega$ -аминогексильной производной сефарозы-4В и пиридоксаль-5'-фосфатом.

Наиболее эффективное связывание пиридоксаль-5'-фосфата с сефарозой наблюдается при pH 8,5 (рис. 1). Увеличение продолжительности реакции от 4 до 8 ч и концентрации пиридоксаль-5'-фосфата от 40 до 100 мМ несколько улучшает эффективность реакции. В этих условиях при pH 8,5 количество пиридоксаль-5'-фосфата, связывающегося с сефарозой, увеличивается от 2,8 до 3,1 моль/мл сефарозы. Полученный при этом образец модифицированной пиридоксаль-5'-фосфатом сефарозы (PLP-сефарозы) был использован в дальнейшем для иммобилизации глутаматдегидрогеназы.

Иммобилизованный на PLP-сефарозе выбранным способом (см. «Экспериментальную часть») фермент сохраняет ~15–20% каталитической активности, а гексамер иммобилизован на носителе посредством вовлечения в ковалентную связь в среднем четырех из шести протомеров (табл. 1). Ранее было отмечено, что пиридоксаль-5'-фосфат способен к образованию основания Шиффа как с остатком  $Lys^{126}$ , так и с остатком  $Lys^{333}$  глутаматдегидрогеназы [12]. Для ограничения числа возможных сшивок гексамера фермента с PLP-сефарозой нами была предпринята попытка иммобилизации глутаматдегидрогеназы в присутствии  $10^{-3}$  М NADPH и  $10^{-1}$  М  $\alpha$ -кетоглутарата. При модификации растворимой глутаматдегидрогеназы в этих условиях фермент полностью сохраняет ката-

литическую активность, а количество фосфопиридоксильных остатков, приходящихся на 1 моль протомеров глутаматдегидрогеназы, уменьшается вдвое по сравнению с белком, модифицированным в отсутствие лигандов (табл. 2). Иммунизация глутаматдегидрогеназы на PLP-сефарозе в аналогичных условиях (табл. 1) приводит к увеличению удельной активности иммобилизованного фермента более чем в 2 раза по сравнению с активностью глутаматдегидрогеназы, иммобилизованной в отсутствие NADPH и  $\alpha$ -кетоглутарата. Этот факт, по всей вероятности, обусловлен защитой каталитически важного остатка Lys<sup>123</sup> от взаимодействия с PLP-сефарозой. Вместе с тем количество субъединиц глутаматдегидрогеназы, вовлекаемых в ковалентную связь с PLP-сефарозой, существенно не уменьшается. На основании этого можно заключить, что иммобилизация глутаматдегидрогеназы в отмеченных условиях осуществляется за счет вовлечения в реакцию остатка Lys<sup>333</sup>.

Согласно данным Талбота и соавт. [12], модификация остатка Lys<sup>333</sup> сопровождается частичной десенсибилизацией глутаматдегидрогеназы к действию аллостерического ингибитора — GTP. Это обстоятельство позволяет допустить, что присутствие GTP и NADH, связывающегося при высоких концентрациях как в активном, так и в регуляторном центре глутаматдегидрогеназы [14], может отразиться на уровне модификации фермента.

При одновременном присутствии в реакционной смеси NADH,  $\alpha$ -кетоглутарата и GTP уровень модификации растворимой глутаматдегидрогеназы заметно уменьшается и зависит от концентрации GTP при фиксированных концентрациях NADH и  $\alpha$ -кетоглутарата (табл. 2). Следовательно, иммобилизуя глутаматдегидрогеназу в присутствии этих лигандов, можно добиться ограничения числа протомеров, вовлекаемых в ковалентную связь с PLP-сефарозой.

При иммобилизации фермента в присутствии  $5 \cdot 10^{-4}$  М GTP,  $2 \cdot 10^{-3}$  М NADH и  $10^{-1}$  М  $\alpha$ -кетоглутарата количество фермента на 1 мл набухшей сефарозы составляет 0,2 мг, удельная активность фермента заметно превышает таковую при иммобилизации в отсутствие лигандов и составляет 75–80% от активности нативного фермента (табл. 1). Вместе с тем гексамер глутаматдегидрогеназы иммобилизуется на PLP-сефарозе путем вовлечения в ковалентную связь лишь одного из шести протомеров.

Полученный таким способом образец иммобилизованной глутаматдегидрогеназы был использован для изучения процесса его денатурации под влиянием гуанидингидрохлорида. На рис. 2 приведены зависимости активности нативной и иммобилизованной глутаматдегидрогеназ от концентрации гуанидингидрохлорида после предварительной инкубации образцов ферментов в течение 30 мин в средах, содержащих различные концентрации гуанидингидрохлорида. Точка полуденатурации  $C_0$  для нативного фермента соответствует 2,2 М гуанидингидрохлориду. Это хорошо согласуется с аналогичными данными, полученными методами флуоресценции и дисперсии оптического вращения [4]. В случае же иммобилизованного фермента точке полуденатурации  $C_0$  соответствует 3 М гуанидингидрохлорид, что свидетельствует об увеличении стабильности фермента при иммобилизации. Переход иммобилизованной глутаматдегидрогеназы из нативного в денатурированное состояние происходит в узком интервале концентраций гуанидингидрохлорида. Оценка параметра кооперативности процесса денатурации дает значение  $N$  20–22, что совпадает с величиной аналогичного параметра для нативного фермента [4] и свидетельствует о высокой степени кооперативности перехода иммобилизованной глутаматдегидрогеназы из нативного в денатурированное состояние.

На рис. 3 показана зависимость ферментативной активности иммобилизованной глутаматдегидрогеназы от концентрации гуанидингидрохлорида после инкубации образцов гелей в течение 30 мин в среде, содержащей гуанидингидрохлорид, и их последующей фильтрации и промывания. Там же приведено количество белка, диссоциирующего с геля после его обработки гуанидингидрохлоридом, в зависимости от концентрации по-

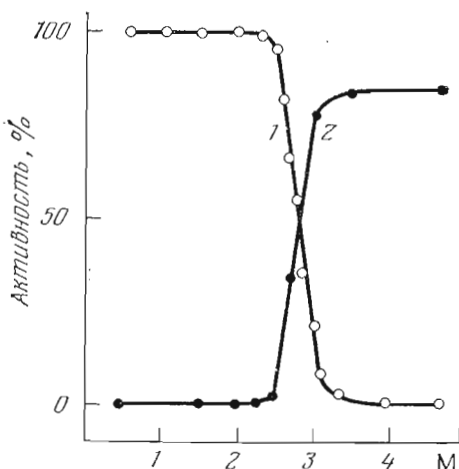


Рис. 3

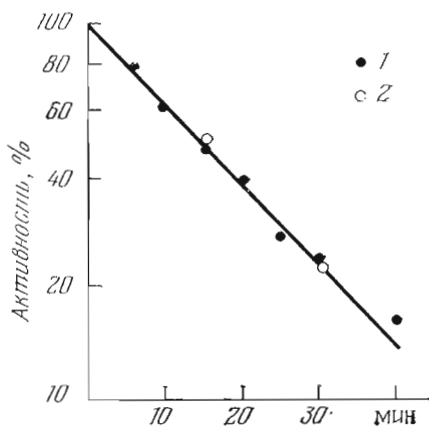


Рис. 4

Рис. 3. Зависимость активности иммобилизованной глутаматдегидрогеназы (1) и количества белка, диссоциируемого с носителя (2) гуанидингидрохлоридом, от концентрации последнего. Активность определяли после инкубации образцов гелей в течение 30 мин при 25°С в средах, содержащих гуанидингидрохлорид, и их последующей фильтрации и промывания

Рис. 4. Кинетика денатурации (1) и диссоциации (2) иммобилизованной глутаматдегидрогеназы под влиянием 3 М гуанидингидрохлорида. За 100% принято количество белка, диссоциируемого с геля под действием 2% додецилсульфата натрия или 4,7 М гуанидингидрохлорида

следнего. Практически полное совпадение зависимостей активностей, представленных на рис. 2 и 3, свидетельствует о необратимости процесса денатурации иммобилизованной глутаматдегидрогеназы.

Данные рис. 3 указывают на то, что диссоциация гексамера глутаматдегидрогеназы под действием гуанидингидрохлорида происходит в одну стадию. При этом гексамер диссоциирует в том же интервале концентраций гуанидингидрохлорида, в котором наблюдается денатурация, а диссоциация характеризуется параметром кооперативности  $N$ , равным 19–22, близким к параметру кооперативности процесса денатурации. Из кинетических зависимостей денатурации и диссоциации под влиянием 3 М гуанидингидрохлорида (рис. 4) следует, что оба процесса характеризуются одной и той же константой скорости первого порядка  $k_c = 3,5 \cdot 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ . Учитывая вышеприведенные данные, а также то обстоятельство, что конечным продуктом диссоциации глутаматдегидрогеназы является мономер, ковалентно пришитый к сефарозе, следует заключить, что в интервале концентраций гуанидингидрохлорида 2,5–3,5 М происходит диссоциация гексамера до мономеров.

Полученные результаты соответствуют данным работы Сугрובовой и соавт. [4], согласно которым денатурация растворимой глутаматдегидрогеназы происходит через «медленную» стадию диссоциации до мономеров с их последующей «быстрой» денатурацией. Вместе с тем результаты настоящей работы не дают оснований для предположения о двухступенчатой диссоциации глутаматдегидрогеназы под действием гуанидингидрохлорида, как это отмечено Таширо и соавт. [3] (см. выше). Можно допустить, что указанные противоречия с работой [3] обусловлены иммобилизацией глутаматдегидрогеназы на PLP-сефарозе. Однако проведенные нами седиментационные исследования растворимой глутаматдегидрогеназы показали, что в интервале концентраций гуанидингидрохлорида от 0 до 1,5 М величина коэффициента седиментации  $S_{20, w}$  не изменяется и составляет  $11,3 \pm 0,2$ . Следовательно, гуанидингидрохлорид вплоть до 1,5 М не вызывает диссоциации гексамера глутаматдегидрогеназы.

В работе использовали следующие реактивы: NADH, NADPH,  $\alpha$ -кетоглутарат,  $\beta$ -меркаптоэтанол, гуанидингидрохлорид (Sigma, США), GTP, гексаметилендиамин, EDC, пиридоксаль-5'-фосфат (Serva, ФРГ),  $\text{NaBH}_4$  (Koch-Light, Laboratories Ltd, Англия), EDTA (Reanal, ВНР). Остальные реактивы — марки х. ч.

*Глутаматдегидрогеназу* из печени крупного рогатого скота (уд. акт. — 36 ед./мг белка; за единицу активности принято количество белка, которое катализирует превращение 1 мкмоль субстрата в 1 мин) выделяли по методу [15].

Концентрацию глутаматдегидрогеназы в растворе определяли спектрофотометрически, принимая коэффициент поглощения при  $\lambda$  280 равным  $0,97 \text{ (см} \cdot \text{мг/мл)}^{-1}$  [16]. При определении концентрации белка в растворах гуанидингидрохлорида или додецилсульфата натрия в коэффициент экстинкции вводили поправку, обусловленную денатурацией белка.

Активность растворимой глутаматдегидрогеназы определяли по начальной скорости изменения экстинкции NADH при 340 нм в процессе реакции восстановительного аминирования  $\alpha$ -кетоглутарата. Концентрации реагентов в реакционной смеси были следующими:  $10^{-4}$  М NADH,  $5 \cdot 10^{-3}$  М  $\alpha$ -кетоглутарат и  $5 \cdot 10^{-2}$  М  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Измерения проводили в кювете с длиной оптического пути 1 см, содержащей 2 мл реакционной смеси в 0,1 М калий-фосфатном буфере, pH 7,8, при 25°С. Реакцию инициировали добавлением 6 мкг фермента.

*Модификация растворимой глутаматдегидрогеназы пиридоксаль-5'-фосфатом.* 2 мг глутаматдегидрогеназы растворяли в 1 мл 0,5 мМ раствора пиридоксаль-5'-фосфата в 0,1 М калий-фосфатном буфере, pH 7,8, и инкубировали 40 мин при 25°С без доступа света. Затем небольшими порциями добавляли сухой  $\text{NaBH}_4$  до исчезновения желтой окраски. Низкомолекулярные компоненты реакции удаляли гель-хроматографией на колонке ( $2 \times 40$  см) с сефадексом G-25. Модификацию в присутствии специфических лигандов проводили в тех же условиях.

Концентрацию пиридоксаль-5'-фосфата определяли спектрофотометрически, используя молярный коэффициент поглощения  $\epsilon_{388} = 4900 \text{ М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$  при pH 7,0 [17]. Концентрацию глутаматдегидрогеназы, модифицированной пиридоксаль-5'-фосфатом, определяли по методу Лоури [18].

*$\omega$ -Аминогексильное производное сефарозы-4В* получали по методу Каутрекаса [19]. Сефарозу-4В активировали  $\text{BrCN}$  из расчета 0,2 мг  $\text{BrCN}$  на 1 мл набухшей сефарозы. К 10 мл предварительно активированной  $\text{BrCN}$  сефарозы-4В добавляли 20 ммоль гексаметилендиамина в 20 мл дистиллированной воды, pH 10,0. После 18-часовой инкубации смеси при 4°С гель отмывали трижды 2 л холодной воды. Полученное  $\omega$ -алкильное производное сефарозы было использовано для получения PLP-сефарозы.

Количество пиридоксаль-5'-фосфата, связанного с сефарозой, определяли спектрофотометрически по амплитуде полосы поглощения при 328 нм, после предварительной обработки PLP-сефарозы боргидридом натрия до полного исчезновения желтой окраски. Спектры поглощения снимали, суспендируя 50 мкл набухшего геля в 2 мл 50% (по объему) водно-глицериновой смеси при pH 7,0. Калибровочную кривую строили по данным спектров поглощения свободного пиридоксаль-5'-фосфата, обработанного  $\text{NaBH}_4$ , полученных в аналогичных условиях.

*Иммобилизация глутаматдегидрогеназы на PLP-сефарозе.* 5 мл набухшего геля PLP-сефарозы фильтровали через стеклянный фильтр и ресуспендировали в 6 мл 0,1 М калий-фосфатного буфера, pH 7,8, содержащего 5,1 мг глутаматдегидрогеназы. Суспензию выдерживали 1 ч при 25°С без доступа света. Затем добавляли небольшими порциями твердый  $\text{NaBH}_4$ , непрерывно перемешивая суспензию до исчезновения характерной для пиридоксаль-5'-фосфата желтой окраски. pH суспензии доводили до 5,8 добавлением 1 М фосфатного буфера для разложения непрореагировавшего  $\text{NaBH}_4$ . Суспензию отфильтровывали, осадок дважды промы-

вали 5 мл 1 М NaCl в 0,1 М фосфатном буфере, pH 7,8, для удаления из геля нековалентно связанного белка. Фильтрат объединяли и определяли в нем содержание глутаматдегидрогеназы, не прореагировавшей с PLP-сефарозой.

Количество глутаматдегидрогеназы, связывающейся с сефарозой при иммобилизации, определяли как разность между начальным и конечным количеством белка в растворе, а также по соответствующей разности общей ферментативной активности.

*Количество белка, диссоциировавшего с сефарозы под действием гуанидингидрохлорида*, определяли, используя следующую процедуру: 5 мл набухшей сефарозы помещали на стеклянный фильтр, отфильтровывали под вакуумом и ресуспендировали в 6 мл раствора, содержащего гуанидингидрохлорид. Суспензию инкубировали 30 мин при 25° С, затем отфильтровывали под вакуумом и трижды промывали 5 мл раствора гуанидингидрохлорида той же концентрации. Фильтрат объединяли и спектрофотометрическим методом определяли в нем количество белка.

*Количество протомеров глутаматдегидрогеназы*, вовлекаемых в ковалентную связь с PLP-сефарозой, определяли как разность между количеством белка, иммобилизованного на сефарозе, и количеством диссоциировавшего белка после инкубации геля в течение 1 ч при 25° С в среде, содержащей 4,7 М гуанидингидрохлорид или 2% додецилсульфат натрия.

*Для определения начальной скорости реакции*, катализируемой иммобилизованной глутаматдегидрогеназой, в 3 мл стандартной реакционной смеси, используемой для определения активности растворимого фермента (см. выше), добавляли 50 мкл геля, содержащего 1,1 мкг глутаматдегидрогеназы, и, непрерывно перемешивая, инкубировали при 25° С в течение различных интервалов времени (до 10 мин). По истечении времени инкубации раствор отфильтровывали и определяли поглощение NADH в фильтрате.

*Денатурацию* растворимой глутаматдегидрогеназы проводили, инкубируя фермент (0,5 мг/мл) при 25° С в 0,2 М фосфатном буфере, pH 7,3, содержащем  $10^{-2}$  М  $\beta$ -меркаптоэтанол,  $5 \cdot 10^{-4}$  М EDTA и гуанидингидрохлорид в различных концентрациях. Степень денатурации определяли по убыли каталитической активности фермента [4]. В аналогичных условиях проводили денатурацию иммобилизованной глутаматдегидрогеназы. Параметр кооперативности денатурации ( $N$ ) определяли по методу, описанному в работе [4].

Коэффициент седиментации определяли на аналитической центрифуге Spinco, модель E (Beckman, США), с адсорбционной сканирующей оптической системой при 280 нм. Скорость вращения ротора 44 000 об/мин. Для предотвращения образования высокомолекулярных ассоциатов концентрация глутаматдегидрогеназы в седиментационных экспериментах составляла 0,09 мг/мл [20]. Эксперименты проводили при 15° С в 0,2 М фосфатном буфере, pH 7,8, содержащем  $10^{-2}$  М  $\beta$ -меркаптоэтанол и  $5 \cdot 10^{-4}$  М EDTA.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Reisler E., Pouyet Y., 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. Tashiro P., Inoue T., Shimozaawa P. Biochim. et biophys. acta, 1982, v. 706, № 1, p. 129–135.
4. Сузробова Н. П., Гуревич В. М., Чеботарева Н. А., Курганов Б. И. Биохимия, 1979, т. 44, вып. 3, с. 424–431.
5. Carvajal N., Martinez Y., Fernandez H. Biochim. et biophys. acta, 1977, v. 481, № 1, p. 177–183.
6. Муронец В. И., Головина Т. О., Наградова Н. К. Биохимия, 1982, т. 47, № 1, с. 3–12.
7. Muronetz V. I., Zueva V. S., Nagradova N. K. FEBS Lett., 1979, v. 107, № 2, p. 277–280.
8. Cherednikova T. V., Muronetz V. I., Nagradova N. K. Biochim. et biophys. acta, 1980, v. 613, № 2, p. 292–308.
9. Battle A. M. C., Stella A. M., Ferramola A. M. et al. Intern. J. Biochem., 1978, v. 9, № 5, p. 401–406.

10. Муронец В. И., Чередникова Т. В., Наградова Н. К. Биохимия, 1981, т. 46, № 10, с. 1731-1739.
11. Ikeda S., Fukui S. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1973, v. 52, № 2, p. 482-488.
12. Talbot Y.-C., Gros C., Cosson M.-P., Pantaloni D. Biochim. et biophys. acta, 1977, v. 494, № 1, p. 19-32.
13. Готтх М. Б., Ивановская М. Г., Шабарова З. А. Биоорган. химия, 1983, т. 9, № 8, с. 1063-1067.
14. Krause J., Buhner M., Sund H. Eur. J. Biochem., 1974, v. 41, № 2, p. 593-602.
15. Агаджанян С. А., Арутюнян А. А., Карабашян Л. В. Биоорган. химия, 1984, т. 10, № 9, с. 1171-1176.
16. Olson J. A., Anfinsen C. B. J. Biol. Chem., 1952, v. 197, № 1, p. 67-79.
17. Peterson E. A., Sober H. A. J. Amer. Chem. Soc., 1954, v. 76, № 1, p. 169-175.
18. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem., 1951, v. 193, № 1, p. 256-266.
19. Cautrecasas P. J. Biol. Chem., 1970, v. 245, № 12, p. 3059-3065.
20. Ifflaender U., Markau K., Sund H. Eur. J. Biochem., 1975, v. 52, № 1, p. 211-220.

Поступила в редакцию

12.V.1985

после доработки

19.VII.1985

# GLUTAMATDEHYDROGENASE IMMOBILIZATION ON SEPHAROSE 4B MODIFIED BY PYRIDOXAL-5'-PHOSPHATE. INVESTIGATION OF THE HEXAMER DISSOCIATION INDUCED BY GUANIDINE CHLORIDE

AVETISSYAN S. H., AGAJANYAN S. A., KAZARYAN R. A.,  
KARABASHYAN L. V.

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

A method has been developed for the glutamatdehydrogenase immobilization on sepharose 4B, modified by pyridoxal-5'-phosphate, by covalent coupling of a subunit of the enzyme hexamer. It was shown that guanidine chloride in subdenaturing concentrations does not cause dissociation of the enzyme hexamer, whereas the denaturation of the immobilized enzyme under the action of the reagent does proceed via the hexamer dissociation to monomers.