



УДК 577.152.141*3.13

СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ГЕКСАМЕРА
ГЛУТАМАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ 3.* ВЛИЯНИЕ КОФЕРМЕНТА
И СУБСТРАТА НА ИНДУЦИРУЕМЫЕ МОЧЕВИНОЙ
ДИССОЦИАЦИЮ И ИНАКТИВАЦИЮ ГЕКСАМЕРА

Барабашян Л. В., Агаджанян С. А., Давоян К. В.,
Казарян Р. А.

Институт экспериментальной биологии Академии наук АрмССР, Ереван

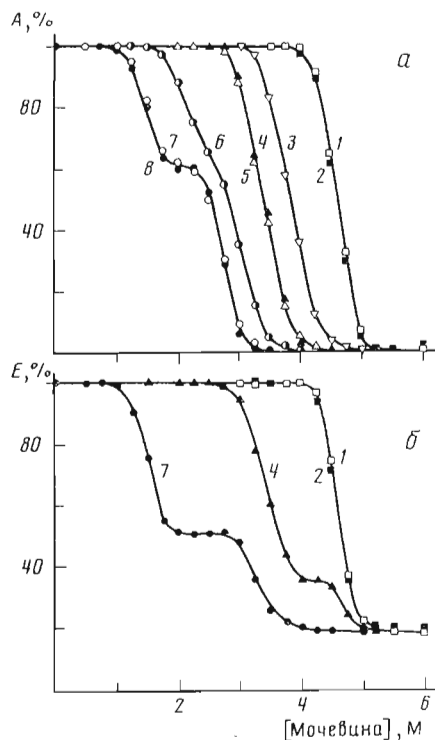
Изучено влияние кофермента (NADH) и субстрата (2-оксоглутарата) на индуцируемые мочевиной диссоциацию и инактивацию иммобилизованного фосфопиридоксильного производного глутаматдегидрогеназы (*L*-глутамат-NAD(P)-оксидоредуктазы, КФ 1.4.1.3) печени быка. Показано, что в присутствии NADH мочевины в области концентраций 3,0—4,0 М индуцирует диссоциацию гексамера до иммобилизованного димера, не проявляющего каталитической активности. При одновременном присутствии NADH и 2-оксоглутарата в области концентраций мочевины 1,0—2,0 М происходит диссоциация гексамера до конформационно устойчивого иммобилизованного тримера, обладающего 60% каталитической активности гексамера. Изучение регуляторных свойств иммобилизованного тримера показало, что аллостерическое ингибирование глутаматдегидрогеназы GTP реализуется в рамках тримеров, в которых субъединицы взаимодействуют посредством идентичных гетерологических контактов.

Ранее на основании изучения каталитических и регуляторных свойств фосфопиридоксильных производных глутаматдегидрогеназы было показано, что субъединицы в составе каталитически активного гексамера фермента ориентированы эквивалентно [2, 3]. Согласно этим данным, в рамках физических моделей гексамера, описываемых группой точечной симметрии 3_2 в форме треугольной призмы [4] или антипризмы [5], субъединицы взаимодействуют посредством двух типов контактов: идентичных гетерологических и идентичных изоологических. Базируясь на этих моделях, гексамер глутаматдегидрогеназы может быть представлен в виде структуры, состоящей из двух эквивалентных тримеров ($2\alpha_3$) или трех эквивалентных димеров ($3\alpha_2$). При этом субъединицы в составе тримеров α_3 взаимодействуют посредством гетерологических контактов, а в составе димеров α_2 — посредством изоологических контактов [3]. Веские свидетельства в пользу подобной структурной организации гексамера глутаматдегидрогеназы были получены при изучении диссоциации иммобилизованного на BrCN-активированной сефарозе фосфопиридоксильного производного фермента [1]. Согласно этим данным, мочевины в зависимости от pH среды индуцирует диссоциацию гексамера глутаматдегидрогеназы до иммобилизованного мономера, димера или тримера.

В настоящее время известно, что взаимодействие глутаматдегидрогеназы с коферментами характеризуется отрицательной кооперативностью, а образование фермент-коферментных комплексов сопровождается конформационной изомеризацией гексамера в целом [6—12]. При этом, хотя необходимым условием изменения конформационного состояния глутаматдегидрогеназы является взаимодействие фермента с коферментом, характер этой конформационной изомеризации зависит также и от участия во взаимодействии с ферментом субстратов или их структурных аналогов [10—12]. Очевидно, что подобное изменение конформационного состояния гексамера глутаматдегидрогеназы затрагивает также и области межсубъединичных контактов. Вследствие этого

* Сообщение 2 см. [1].

Рис. 1. Зависимости активности иммобилизованного гексамера глутаматдегидрогеназы (а) и содержания белка E, % (здесь и на рис. 2, 3) в расчете на 1 мл осевшего геля (б) от концентрации мочевины после инкубации в средах, содержащих различные концентрации лигандов: 1 — без лигандов; 2 — $5 \cdot 10^{-2}$ М 2-оксоглутарат; 3 — $5 \cdot 10^{-5}$ М NADH; 4 — $2 \cdot 10^{-4}$ М NADH; 5 — 10^{-3} М NADH; 6 — $2 \cdot 10^{-4}$ М NADH и $5 \cdot 10^{-4}$ М 2-оксоглутарат; 7 — $2 \cdot 10^{-4}$ М NADH и $5 \cdot 10^{-3}$ М 2-оксоглутарат; 8 — $2 \cdot 10^{-4}$ М NADH и $5 \cdot 10^{-2}$ М 2-оксоглутарат. Инкубацию проводили в 0,1 М калий-фосфатном буфере, рН 7,2, при 25° С в течение 30 мин



можно ожидать, что взаимодействие глутаматдегидрогеназы с кофферментами и субстратами отразится на характере диссоциации гексамера.

В настоящей работе с использованием иммобилизованного на BrCN-активированной сефарозе фосфопиридоксильного производного глутаматдегидрогеназы проведено исследование индуцируемых мочевиной процессов диссоциации и инактивации фермента в присутствии NADH и 2-оксоглутарата. Предпринята попытка выяснения роли различных типов межсубъединичных контактов в функционировании каталитически активного гексамера глутаматдегидрогеназы.

Из приведенных на рис. 1а данных видно, что увеличение концентрации NADH снижает устойчивость образца фермента к инактивации мочевиной. Концентрация мочевины, при которой наблюдается полуинактивация фермента в присутствии $2 \cdot 10^{-4}$ М NADH, понижается от 4,6 до 3,4 М и не изменяется при повышении концентрации NADH до 10^{-3} М. Ранее было показано, что при нейтральных значениях рН инактивация иммобилизованного производного глутаматдегидрогеназы происходит в результате диссоциации гексамера до каталитически неактивного мономера, минуя стадию образования других конформационно устойчивых олигомерных ферментов [4, 13]. Учитывая эти данные, можно предположить, что наблюдаемое понижение устойчивости иммобилизованного производного фермента к инактивации мочевиной может быть обусловлено влиянием кофермента на характер диссоциации гексамера. С целью выяснения этого вопроса было изучено влияние NADH на диссоциацию иммобилизованного производного глутаматдегидрогеназы под действием мочевины. Как видно из рис. 1б, гексамерная форма фермента в присутствии $2 \cdot 10^{-4}$ М NADH диссоциирует до мономера в две ступени. При повышении концентрации мочевины от 2,8 до 4,0 М с носителя смывается около 65% иммобилизованного белка. Иначе говоря, в указанной области концентраций мочевины гексамер диссоциирует до иммобилизованного димера. Дальнейшее повышение содержания мочевины в инкубационной среде приводит к диссоциации димера до мономера (в интервале 4,3—5,0 М мочевины).

Согласно кинетике инактивации и диссоциации иммобилизованного гексамера глутаматдегидрогеназы в присутствии $2 \cdot 10^{-4}$ М NADH под

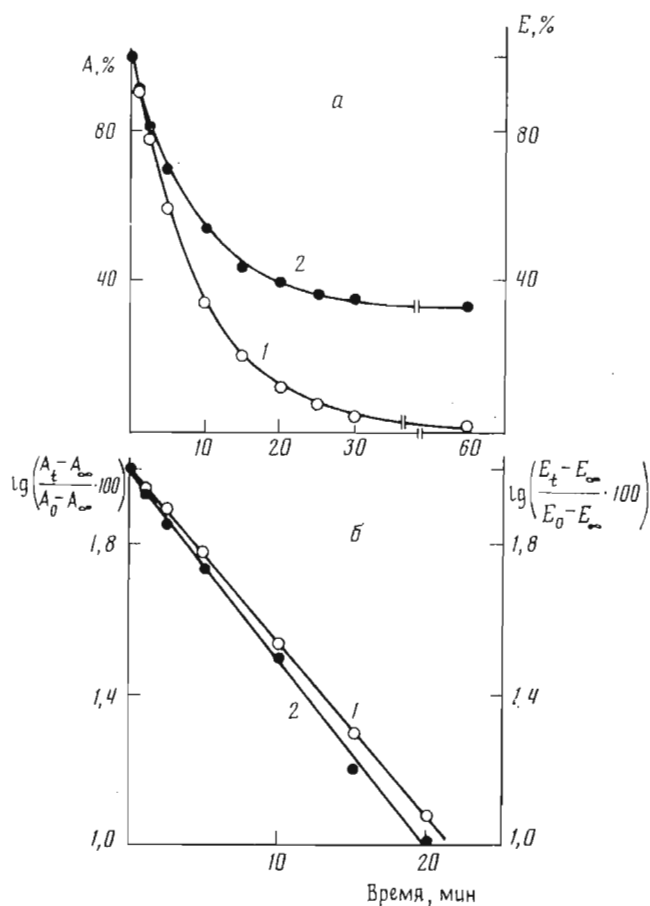


Рис. 2. Кинетика инактивации (1) и диссоциации (2) иммобилизованного производного глутаматдегидрогеназы в присутствии $2 \cdot 10^{-4}$ М NADH под влиянием 4 М мочевины (а). б — те же зависимости в полулогарифмических координатах. Инкубацию проводили в 0,1 М калий-фосфатном буфере, рН 7,2, при 25°C

влиянием 4 М мочевины, инактивация фермента сопровождается диссоциацией гексамера до димера (рис. 2а). Оба процесса (инактивации и диссоциации до димера) описываются кинетической зависимостью реакций первого порядка и характеризуются близкими значениями констант скоростей, составляющими $0,11$ и $0,12 \text{ мин}^{-1}$ соответственно (рис. 2б). Эти данные позволяют заключить, что индуцируемая в присутствии NADH инактивация иммобилизованной глутаматдегидрогеназы обусловлена ее диссоциацией до не проявляющего каталитической активности иммобилизованного димера. Таким образом, согласно полученным результатам, в присутствии NADH гексамер диссоциирует до мономера через стадию образования конформационно устойчивого, каталитически неактивного димера.

Ранее на растворимой форме глутаматдегидрогеназы было показано, что субстраты и их структурные аналоги в сочетании с коферментом приводят к конформационной изомеризации гексамера, отличающейся по характеру от изомеризации, индуцируемой только коферментами [10—12]. Проведенные нами исследования показали, что сам по себе субстрат глутаматдегидрогеназы (2-оксоглутарат) в концентрациях до $5 \cdot 10^{-2}$ М не оказывает влияния на диссоциацию и инактивацию иммобилизованного фосфопиридоксильного производного глутаматдегидрогеназы (рис. 1). Вместе с тем, как это видно из приведенных на рис. 1а данных, при одновременном присутствии в инкубационной среде $2 \cdot 10^{-4}$ М NADH и $5 \cdot 10^{-3}$ М 2-оксоглутарата при повышении концентрации мочевины про-

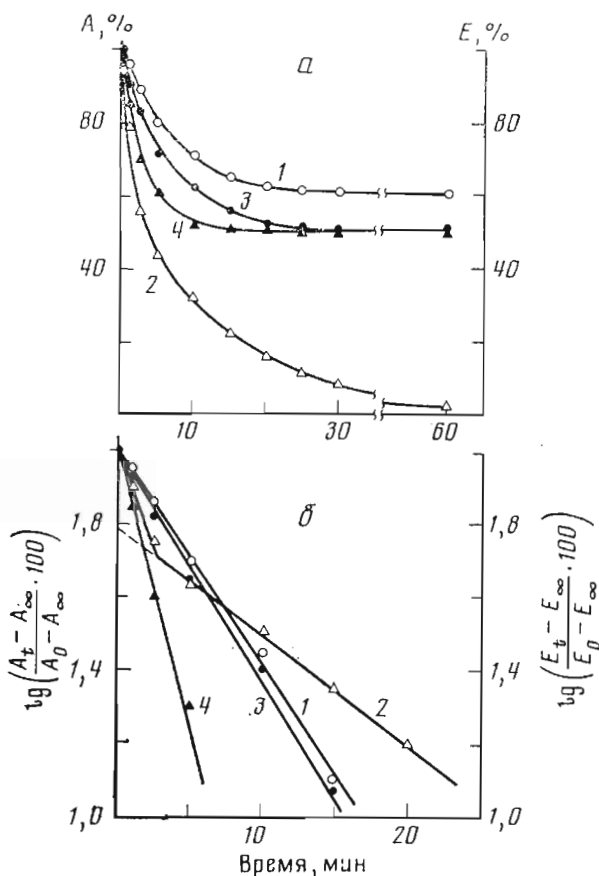


Рис. 3. Кинетика инактивации (1, 2) и диссоциации (3, 4) иммобилизованного производного глутаматдегидрогеназы в присутствии $2 \cdot 10^{-4}$ М NADH и $5 \cdot 10^{-3}$ М 2-оксоглутарата под влиянием 2 (1, 3) и 3 М (2, 4) мочевины (а). б — те же зависимости в полулогарифмических координатах. Условия см. рис. 2

исходит двухступенчатая инактивация иммобилизованного фермента. В интервале концентраций мочевины 1,0—2,0 М фермент теряет около 40% каталитической активности. Затем в интервале 2,3—3,2 М мочевины происходит полная инактивация фермента. Одновременно с частичной инактивацией глутаматдегидрогеназы в интервале 1,0—2,0 М мочевины с носителя диссоциирует около 50% иммобилизованного белка (рис. 1б). Иначе говоря, в этих условиях происходит диссоциация гексамера до иммобилизованного тримера. Дальнейшая полная инактивация фермента, наблюдаемая в интервале 2,3—3,2 М мочевины, происходит практически без дальнейшей диссоциации белка с носителем.

Кинетические зависимости инактивации и диссоциации иммобилизованного производного глутаматдегидрогеназы в присутствии NADH и 2-оксоглутарата, индуцируемые 2 или 3 М мочевиной, свидетельствуют, что независимо от концентрации мочевины фермент диссоциирует до тримеров (рис. 3а). При 2 М концентрации мочевины фермент инактивируется на 40%. Из тех же кинетических зависимостей, представленных в полулогарифмических координатах (рис. 3б), следует, что оба процесса (инактивации и диссоциации до тримера) при концентрации мочевины 2 М характеризуются близкими значениями констант скорости реакции первого порядка, равными 0,14 и 0,15 мин^{-1} . Приведенные данные свидетельствуют о том, что наблюдаемое понижение ферментативной активности обусловлено диссоциацией гексамера до иммобилизованного тримера. Полученный при этом иммобилизованный тример обладает 60% активности гексамера и устойчив к инактивации присутствующей в среде мо-

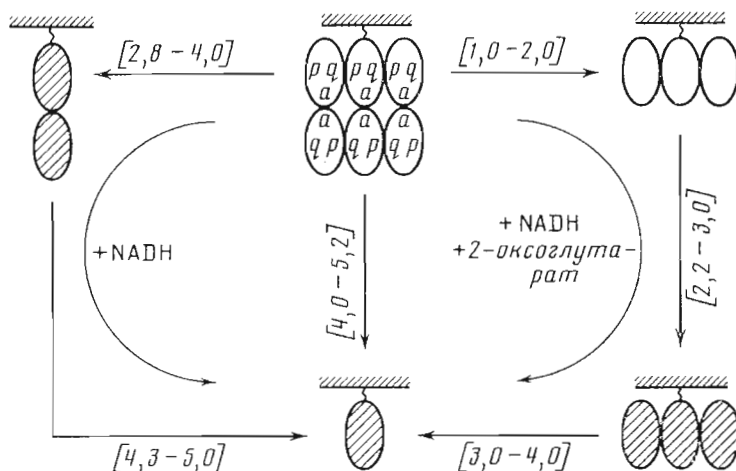


Рис. 4. Схема путей диссоциации иммобилизованного гексамера глутаматдегидрогеназы под влиянием мочевины в присутствии различных лигандов. Гексамер представлен в виде развертки с эквивалентной ориентацией субъединиц [3]. В скобках приведены интервалы концентраций мочевины, при которых происходит диссоциация до соответствующих фрагментов. Штриховкой обозначены субъединицы, не обладающие каталитической активностью

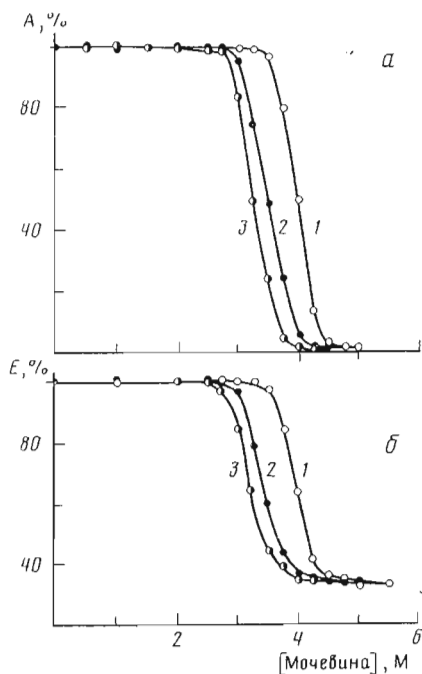
чевиной по крайней мере в течение 60 мин. Вместе с тем при повышении концентрации мочевины до 3 М в течение 30 мин происходит полная инактивация гексамера (рис. 3а). Однако при этом иммобилизованный гексамер также диссоциирует до тримера.

Как видно из рис. 3б, процесс инактивации фермента в отличие от диссоциации аппроксимируется двумя линейными участками. Первая, быстрая, стадия этого процесса, очевидно, обусловлена диссоциацией гексамера до тримера. На второй же, более медленной, стадии инактивация фермента происходит без изменения степени олигомерности тримера. Вследствие этого можно полагать, что в присутствии 3 М мочевины гексамер диссоциирует до тримера, проявляющего каталитическую активность. Однако в дальнейшем под влиянием присутствующей в среде мочевины происходит его изомеризация до каталитически неактивного конформера. Экстраполяция линейного участка второй, медленной, стадии инактивации фермента в присутствии 3 М мочевины до пересечения с осью ординат (рис. 3б) показывает, что каталитическая активность иммобилизованного тримера в начальный момент диссоциации составляет около 60% от активности иммобилизованного гексамера. Приведенное значение активности соответствует активности иммобилизованного тримера, полученного в аналогичных условиях, однако при концентрации мочевины в инкубационной среде 2 М.

Таким образом, в присутствии NADH и 2-оксoглутарата иммобилизованный гексамер диссоциирует до мономера через стадию образования каталитически активного тримера. Эти данные совместно с данными по изучению диссоциации гексамера в присутствии NADH подтверждают представление об эквивалентной ориентации субъединиц в рамках физических моделей гексамера, описываемых группой точечной симметрии $3 \ 2$ [3].

На рис. 4 приведены развертка гексамера с подобной упаковкой субъединиц, а также схематическое представление путей диссоциации этого гексамера в присутствии кофермента и субстрата, основанное на результатах настоящей работы. Принимая во внимание структурную организацию гексамера глутаматдегидрогеназы, следует заключить, что в отсутствие лигандов оба типа межсубъединичных контактов обладают близкой устойчивостью к денатурации мочевиной. Вследствие этого при диссоциации гексамера до мономера не удается обнаружить образования сколько-нибудь устойчивых димеров или тримеров. Вместе с тем образование димеров в качестве промежуточного продукта диссоциации ге-

Рис. 5. Зависимости активности иммобилизованного тримера глутаматдегидрогеназы (а) и содержания белка в расчете на 1 мл осевшего геля (б) от концентрации мочевины после инкубации в средах, содержащих различные лиганды: 1 — без лигандов; 2 — 10^{-3} М ГТР; 3 — 10^{-3} М NADH. Инкубацию проводили 30 мин в 0,1 М калий-фосфатном буфере, pH 7,2, при 25°C



ксамера до мономера в присутствии NADH свидетельствует о том, что взаимодействие глутаматдегидрогеназы с коферментом сопровождается относительным понижением устойчивости контактов pq к диссоциации мочевиной. Это заключение основано на том, что, согласно структурной организации гексамера, лишь при диссоциации идентичных гетерологических контактов pq возможно образование димеров. Образование же тройного комплекса фермент—NADH—2-оксоглутарат сопровождается относительным понижением устойчивости изоэлогических контактов aa . Вследствие этого гексамер диссоциирует до каталитически активного тримера, в котором субъединицы взаимодействуют посредством гетерологических контактов pq . Последующая диссоциация этого тримера до мономера в свою очередь происходит через стадию его изомеризации до каталитически неактивного конформера.

Анализ особенностей функционирования каталитически активной формы иммобилизованного тримера глутаматдегидрогеназы может позволить получить информацию о роли различных типов межсубъединичных контактов в стабилизации и функционировании каталитически активного гексамера фермента.

Поскольку иммобилизованной тример обладает около 60% активности гексамера, следует полагать, что изоэлогические межсубъединичные контакты aa не принимают участия в формировании активных центров глутаматдегидрогеназы. Вместе с тем очевидно, что эти контакты участвуют в стабилизации гексамера фермента. Иммобилизованный тример глутаматдегидрогеназы диссоциирует до мономеров и инактивирует в одном и том же интервале концентраций мочевины: 3,5—4,5 М (рис. 5). Эти результаты свидетельствуют о том, что в данной области концентраций мочевины происходит диссоциация гетерологических межсубъединичных контактов pq с образованием не проявляющего активности иммобилизованного мономера. Сопоставление этих данных с аналогичными данными для иммобилизованного гексамера (рис. 1) показывает, что тример обладает меньшей устойчивостью к диссоциации мочевиной. Это обстоятельство, очевидно, связано со стабилизирующим влиянием контактов aa на конформационное состояние гексамера в целом. Однако функция изоэлогических контактов вряд ли ограничивается этим. Поскольку связывание субстрата и кофермента в активном центре глутаматдегидрогеназы влияет на состояние контактов aa , справедливо считать, что они могут участво-

вать в реализации взаимодействия между активными центрами гексамера и в обеспечении кооперативного поведения фермента.

Это предположение хорошо согласуется с полученными ранее [14] данными, свидетельствующими о том, что блокирование ϵ -аминогруппы расположенного в зоне активного центра остатка Lys-126 произвольной субъединицы глутаматдегидрогеназы сопровождается кооперативной инактивацией димерного фрагмента гексамера — α_2 . О возможном участии изоэлогических контактов *aa* в реализации кооперативных взаимодействий между субъединицами глутаматдегидрогеназы свидетельствует также и тот факт, что иммобилизованный тример глутаматдегидрогеназы обладает 60% активности гексамера. Иначе говоря, изолированный иммобилизованный тример обладает большей активностью, чем тот же тример в составе гексамера.

Ранее [2, 3] при изучении регуляторных свойств фосфопиродоксильных производных глутаматдегидрогеназы было показано, что аллостерическое ингибирование фермента GTP осуществляется через один из типов межсубъединичных контактов: *aa* или *pq*. Проведенные нами исследования показали, что каталитически активный иммобилизованный тример глутаматдегидрогеназы не отличается от гексамера по ингибированию со стороны GTP. Эти данные позволяют заключить, что действие аллостерического эффектора реализуется в рамках тримеров посредством гетерологических контактов *pq*. В пользу данного заключения свидетельствует также и тот факт, что GTP, взаимодействуя с иммобилизованным тримером глутаматдегидрогеназы, влияет на индуцируемые мочевиной процессы инактивации и диссоциации последнего до мономера (рис. 5). В присутствии GTP, так же как и в присутствии NADH, происходит понижение устойчивости иммобилизованного тримера к диссоциации и инактивации мочевиной (рис. 5), что, очевидно, свидетельствует о том, что взаимодействие с глутаматдегидрогеназой GTP, так же как и NADH, приводит к изменению состояния гетерологического межсубъединичного контакта *pq*.

Экспериментальная часть

В работе использовали NADH, 2-оксоглутарат, β -меркаптоэтанол (Sigma, США), GTP, пиродоксаль-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) выделяли по методу, описанному ранее [15].

Фосфопиродоксильное производное глутаматдегидрогеназы и его радиоактивную форму (25 мКи/мг белка) получали согласно методу, описанному в работе [16].

Иммобилизацию глутаматдегидрогеназы на BrCN-активированной сефарозе посредством вовлечения в ковалентную связь с носителем лишь одной из субъединиц гексамера проводили аналогично [16]. Полученный препарат иммобилизованного фермента содержал 5,5 мкг белка на 1 мл осевшего геля.

Концентрацию глутаматдегидрогеназы в растворе определяли спектрофотометрически, принимая коэффициент поглощения при 280 нм равным 0,97 (см·мг/мл)⁻¹ [17]. Содержание белка в образцах иммобилизованного фосфопиродоксильного производного глутаматдегидрогеназы определяли по радиоактивности геля, сравнивая ее с удельной радиоактивностью растворимого фосфопиродоксильного производного фермента. Радиоактивность измеряли в сцинтилляторе Брея [18] на счетчике SL-4221 (Франция).

Активность растворимых и иммобилизованных препаратов глутаматдегидрогеназы определяли по скорости изменения поглощения NADH при 340 нм в процессе реакции восстановительного аминирования 2-оксоглутарата согласно методу, описанному ранее [16].

Обработку иммобилизованного производного глутаматдегидрогеназы мочевиной проводили в 0,1 М калий-фосфатном буфере, pH 7,2, содержащем 10⁻² М β -меркаптоэтанол и 10⁻³ М EDTA, как описано в работе [1]. В зависимости от поставленной задачи инкубационная смесь содержала также NADH и 2-оксоглутарат. Содержание белка, остающегося иммобилизованным на 1 мл осевшего носителя после его обработки мочевиной, выражали в виде процентного содержания от количества иммобилизованного белка до обработки геля мочевиной.

ЛИТЕРАТУРА

1. Карабашян Л. В., Агаджанян С. А., Даноян К. В., Казарян Р. А. // Биоорганическая химия. 1988. Т. 14. № 11. С. 1502—1508.
2. Агаджанян С. А., Карабашян Л. В. // Молекулярная биология. 1986. Т. 20. № 4. С. 1062—1069.
3. Агаджанян С. А., Карабашян Л. В. // Молекулярная биология. 1986. Т. 20. № 4. С. 1070—1078.
4. Eisenberg H., Reisler E. // Biopolymers. 1970. V. 9. № 1. P. 113—115.
5. Josephs R. // J. Mol. Biol. 1971. V. 55. № 2. P. 147—153.
6. Krause J., Bühner M., Sund H. // Eur. J. Biochem. 1974. V. 41. № 3. P. 593—602.
7. Alex S., Bell J. E. // Biochem. J. 1980. V. 191. № 2. P. 299—304.
8. Dalziel K., Egan R. R. // Biochem. J. 1972. V. 126. № 4. P. 975—984.
9. George A., Bell J. E. // Biochemistry. 1980. V. 19. № 26. P. 6057—6061.
10. Koberstein R., Sund H. // Eur. J. Biochem. 1973. V. 36. № 3. P. 545—552.
11. Bell E. T., LiMuti C., Renz C. L., Bell J. E. // Biochem. J. 1985. V. 225. № 1. P. 209—217.
12. Chen S.-S., Engel P. C., Bayley P. M. // Biochem. J. 1977. V. 163. № 2. P. 297—302.
13. Аветисян С. Г., Агаджанян С. А., Казарян Р. А., Карабашян Л. В. // Биоорганическая химия. 1986. Т. 12. № 3. С. 332—339.
14. Карабашян Л. В., Агаджанян С. А. // Молекулярная биология. 1988. Т. 22. № 6.
15. Агаджанян С. А., Арутюнян А. А., Карабашян Л. В. // Биоорганическая химия. 1984. Т. 10. № 9. С. 1171—1176.
16. Карабашян Л. В., Агаджанян С. А., Даноян К. В., Казарян Р. А. // Биоорганическая химия. 1988. Т. 14. № 11. С. 1495—1501.
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
3.VI.1988

STRUCTURAL ORGANIZATION OF HEXAMER OF GLUTAMATE DEHYDROGENASE. 3. EFFECTS OF COENZYME AND SUBSTRATE ON THE UREA-INDUCED DISSOCIATION AND INACTIVATION OF THE 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

Effects of coenzyme (NADH) and substrate (2-oxoglutarate) on the urea-induced dissociation and inactivation of immobilized phosphopyridoxyl derivative of bovine liver glutamate dehydrogenase (*L*-glutamate-NAD(P)-oxidoreductase, EC 1.4.1.3) have been studied. Urea at concentration 3.0 to 4.0 M in the presence of NADH induced dissociation of the enzyme's hexamer to catalytically inactive immobilized dimer. In the presence of both NADH and 2-oxoglutarate at the urea concentration 1.0 to 2.0 M the hexamer dissociated to the conformationally stable immobilized trimer possessing 60% catalytic activity of the hexamer. Studies of regulatory properties of the immobilized trimer showed that the allosteric inhibition of glutamate dehydrogenase by GTP was realized on the level of trimers, where the subunits interact through identical heterological contacts.