



УДК 577.152.141*3'13

СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ГЕКСАМЕРА
ГЛУТАМАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ1. ИММОБИЛИЗАЦИЯ НА СЕФАРОЗЕ С ЦЕЛЬЮ ПОЛУЧЕНИЯ
МОДЕЛИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ
ОСОБЕННОСТЕЙ ФЕРМЕНТА*Карабашиян Л. В., Агаджанян С. А., Даноян К. В.,
Газарян Р. А.**Институт экспериментальной биологии Академии наук АрмССР,
Ереван*

Проведена ковалентная иммобилизация глутаматдегидрогеназы (*L*-глутамат: NAD(P)-оксидоредуктазы, КФ 1.4.1.3) печени быка и ее радиоактивного фосфопримидоксильного производного на сефарозе CL-4B с различной степенью активации бромцианом. Изучены каталитические и регуляторные свойства иммобилизованных образцов ферментов. Показано, что при активации сефарозы малым количеством бромциана (ниже 5 мг на 1 мл геля) ферменты иммобилизуются посредством вовлечения в ковалентную связь с носителем одной из субъединиц гексамера. При этом иммобилизация не отражается на каталитических и регуляторных свойствах глутаматдегидрогеназы. Установлено, что иммобилизованное радиоактивное фосфопримидоксильное производное глутаматдегидрогеназы полностью имитирует иммобилизованную нативную глутаматдегидрогеназу и может служить удобной моделью для изучения структурно-функциональных особенностей каталитически активного гексамера глутаматдегидрогеназы.

Для изучения структурной организации и функциональных особенностей олигомерных ферментов в последнее время широко применяются подходы, основанные на иммобилизации ферментов на нерастворимых носителях, главным образом на BrCN-активированной сефарозе [1, 2]. Использование для этих целей иммобилизованных ферментов обладает рядом преимуществ по сравнению с растворимыми препаратами. В частности, при иммобилизации олигомерного фермента на BrCN-активированной сефарозе носитель, как правило, оказывает стабилизирующее действие на субъединицы или иные низкомолекулярные фрагменты олигомера, которые крайне неустойчивы в растворе [3]. Благодаря этому обстоятельству путем диссоциации олигомерных ферментов удалось получить конформационно устойчивые, каталитически активные фрагменты (вплоть до мономеров) целого ряда ферментов: глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы из дрожжей и мышц крысы [4, 5], аргиназы из печени человека и крысы [6–8], транскетолазы из дрожжей [9] и др. Очевидно, что для решения подобных задач иммобилизация не должна существенно влиять на структуру, нативную конформацию и каталитические свойства испытуемого фермента. Другим важным условием, необходимым для корректной интерпретации результатов диссоциации олигомерных ферментов, является их иммобилизация посредством вовлечения в ковалентную связь с носителем лишь одной из субъединиц олигомера. В отмеченных выше работах это достигалось эмпирически, путем вариации количества BrCN, используемого при активации носителя.

Настоящая работа посвящена иммобилизации на BrCN-активированной сефарозе CL-4B глутаматдегидрогеназы из печени быка, каталитически активная единица которой представляет собой гексамер, сформированный из идентичных по аминокислотной последовательности субъединиц [10, 11]. В определенных условиях (при концентрации свыше 0,1 мг/мл или в присутствии ADP) гексамеры глутаматдегидрогеназы способны ассоциировать в линейные полимеры с молекулярной массой до

2 МДа [12]. В связи с этим не исключена возможность иммобилизации глутаматдегидрогеназы в виде агрегатов, состоящих из двух или более гексамерных молекул.

Ранее [13] было показано, что модификация глутаматдегидрогеназы пиридоксаль-5'-фосфатом (при одновременном присутствии в реакционной среде NADH, 2-оксоглутарата и GTP) приводит к образованию не способного к полимеризации фосфопиридоксильного производного фермента, которое не отличается от нативного по каталитическим и регуляторным свойствам. Использование данного производного глутаматдегидрогеназы для иммобилизации на нерастворимом носителе позволяет исключить возможное влияние ассоциации гексамеров на свойства иммобилизованного фермента. Кроме того, фосфопиридоксильное производное глутаматдегидрогеназы обладает тем преимуществом, что его радиоактивная форма позволяет с высокой степенью точности определять количественное содержание белка, иммобилизованного на носителе.

Цель настоящей работы заключалась в получении иммобилизованных производных глутаматдегидрогеназы, близких по своим свойствам к растворимому препарату и пригодных для изучения структурно-функциональных особенностей каталитически активного гексамера фермента.

При увеличении количества BrCN, используемого для активации 1 мл геля сефарозы, от 2,5 до 100 мг количество белка, связывающегося с носителем при иммобилизации, возрастает примерно в 80 раз (табл. 1). При использовании в качестве носителя сефарозы, активированной малым количеством BrCN (ниже 5 мг на 1 мл геля), активности иммобилизованных глутаматдегидрогеназ практически не отличаются от активностей соответствующих растворимых ферментов. При увеличении количества BrCN до 100 мг наряду с увеличением количества белка, связывающегося с носителем, наблюдается существенное понижение (более чем в 3 раза) удельных активностей иммобилизованных препаратов. Оценка количества белка, остающегося связанным на сефарозе после обработки и промывания иммобилизованных образцов глутаматдегидрогеназ 8 М мочевиной, показывает, что при активации сефарозы малым количеством BrCN (до 5 мг на 1 мл геля) фермент иммобилизуется на носителе посредством вовлечения в ковалентную связь одной из субъединиц гексамера. При увеличении количества BrCN до 100 мг на 1 мл геля в ковалентную связь с носителем вовлекается в среднем 2,4 субъединицы гексамера. Сопоставление этих данных с активностями соответствующих иммобилизованных препаратов глутаматдегидрогеназ показывает, что понижение удельной активности фермента наблюдается лишь при вовлечении в ковалентную связь с носителем более чем одной субъединицы. В случае же фиксации гексамера на носителе посредством образования ковалентной связи лишь с одной из субъединиц иммобилизация не влияет на активность фермента. Следует отметить, что, согласно данным, представленным в табл. 1, свойства иммобилизованных фосфопиридоксильных производных глутаматдегидрогеназы практически не отличаются от свойств иммобилизованных в тех же условиях образцов нативного фермента.

В табл. 2 приведены каталитические характеристики иммобилизованных глутаматдегидрогеназ, определенные графически методом Лайнуивера — Бэрка. Как видно, значения K_m (субстрата и кофермента), а также V_{max} реакции восстановительного аминирования 2-оксоглутарата не зависят от образца иммобилизованной глутаматдегидрогеназы (нативного или фосфопиридоксильного производного фермента). Вместе с тем приведенные параметры проявляют заметную зависимость от условий иммобилизации фермента. При иммобилизации гексамера глутаматдегидрогеназы посредством ковалентной фиксации на носителе одной из субъединиц V_{max} реакции и K_m для NADH и 2-оксоглутарата практически совпадают с таковыми для растворимых препаратов фермента. При иммобилизации же гексамера посредством ковалентного связывания более чем одной субъединицы V_{max} реакции существенно понижается и для образца, ковалентно связанного с носителем посредством 2,4 субъединиц, достигает

Свойства иммобилизованных на сефарозе CL-4B нативной глутаматдегидрогеназы * и ее радиоактивного фосфопиридоксильного производного в зависимости от количества BrCN, используемого для активации 1 мл геля сефарозы

Количество BrCN, мг на 1 мл геля	Количество иммобилизованного белка, мкг/мл геля	Активность иммобилизованного фермента, % от активности растворимого фермента	Количество белка на носителе после обработки 8 М мочевиной, мкг/мл геля	Количество субъединиц гексамера, вовлекаемых в ковалентную связь с носителем
2,5	5,5	100	0,9	1,0
4	16	100	2,7	1,0
5	26 (30)	95 (100)	4,5 (5-6)	1,0 (1,0-1,2)
10	62	85	14	1,4
20	154 (160)	61 (58)	43 (50)	1,7 (1,9)
100	446 (460)	30 (30)	178 (185)	2,4 (2,4)

* Данные для иммобилизованного нативного фермента приведены в скобках.

Таблица 2

Каталитические характеристики растворимых и иммобилизованных препаратов нативной глутаматдегидрогеназы * и ее фосфопиридоксильного производного в реакции восстановительного аминирования 2-оксоглутарата

Глутаматдегидрогеназа	V_{max} , мкмоль/мин·мг	$K_m \cdot 10^3$, M	
		2-оксоглутарата	NADH
Растворимая	34 (34)	4,0 (3,8)	0,6 (0,6)
Иммобилизованная на сефарозе, активированной следующим количеством BrCN на 1 мл геля (мг):			
2,5	33 (34)	3,5 (3,3)	0,6 (0,5)
20	20 (20)	1,7 (1,7)	0,7 (0,8)
100	11 (13)	1,2 (1,2)	0,6 (0,7)

* Данные для нативной глутаматдегидрогеназы приведены в скобках.

11–13 мкмоль/(мин·мг) по сравнению с 34 мкмоль/(мин·мг), характерного для растворимого фермента. Одновременно с понижением V_{max} происходит некоторое понижение K_m для 2-оксоглутарата (примерно в 3 раза). В то же время K_m для NADH практически не зависит от числа субъединиц, ковалентно связанных с носителем.

Из данных анализа рН-зависимостей реакций восстановительного аминирования 2-оксоглутарата, катализируемых растворимыми и иммобилизованными препаратами глутаматдегидрогеназ, видно, что образцы глутаматдегидрогеназ, иммобилизованных на носителе посредством ковалентной фиксации одной из субъединиц, по рН-зависимости не отличаются от растворимых препаратов фермента (рис. 1). При увеличении числа субъединиц, вовлекаемых в ковалентную связь с носителем, происходит уширение зоны рН, в которой фермент проявляет максимальную каталитическую активность. При этом наблюдаемый эффект не зависит от иммобилизуемого образца глутаматдегидрогеназы (нативного или фосфопиридоксильного производного фермента).

Согласно данным зависимостей активности иммобилизованных фосфопиридоксильных производных глутаматдегидрогеназ от концентрации аллостерических эффекторов GTP и ADP, образец фермента, иммобилизованный на носителе посредством связывания одной из субъединиц, практически не отличается от растворимого по способности к ингибированию GTP или активированию ADP (рис. 2). При увеличении числа субъеди-

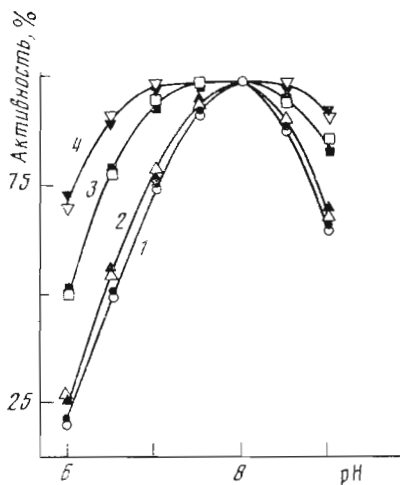


Рис. 1. pH-Зависимости активностей растворимой (1) и иммобилизованных (2—4) глутаматдегидрогеназ в реакции восстановительного аминирования 2-оксоглутарата. 2, 3 и 4 — образцы глутаматдегидрогеназы, иммобилизованные посредством вовлечения в ковалентную связь с носителем в среднем 1,0; 1,7—1,9 и 2,4 субъединиц соответственно. Светлые символы относятся к нативной глутаматдегидрогеназе, темные — к фосфопиридоксильному производному глутаматдегидрогеназы

ниц глутаматдегидрогеназы, вовлекаемых в ковалентную связь с носителем, происходит понижение эффективности аллостерического ингибирования GTP или активации ADP. При иммобилизации гексамера в среднем через 2,4 субъединицы, концентрация GTP, при которой наблюдается полунгибирование фермента, достигает значений $8 \cdot 10^{-5}$ М по сравнению с $6 \cdot 10^{-6}$ М для растворимого фермента. При этом предельный уровень ингибирования иммобилизованного производного глутаматдегидрогеназы при насыщающих концентрациях GTP достигает 16% против 2% для растворимого фермента. Тот же образец иммобилизованного фермента практически полностью теряет способность к активации ADP. Аналогичные закономерности наблюдаются для иммобилизованной нативной глутаматдегидрогеназы.

Таким образом, проведенные исследования показали, что при активации сефарозы CL-4B малым количеством BzCN (до 5 мг на 1 мл геля) глутаматдегидрогеназа иммобилизуется на носителе посредством вовлечения в ковалентную связь лишь одной из субъединиц гексамера. При повышении количества BzCN наблюдается увеличение числа субъединиц гексамера, связывающихся ковалентно с носителем. Анализ каталитических и регуляторных свойств иммобилизованных глутаматдегидрогеназ показал, что при ковалентной фиксации гексамера на носителе через одну субъединицу иммобилизованная глутаматдегидрогеназа практически не отличается от растворимого фермента. Увеличение числа субъединиц гексамера, ковалентно связанных с носителем, сопровождается изменением V_{max} катализируемой реакции, K_m субстрата, pH-зависимости реакции восстановительного аминирования 2-оксоглутарата, а также регуляции со стороны аллостерических эффекторов GTP и ADP. Наблюдаемые изменения свойств фермента скорее всего обусловлены «многоочечной» фиксацией фермента на носителе, приводящей к ограничению конформационных возможностей гексамера в целом. Поскольку ковалентная фиксация глутаматдегидрогеназы через одну из субъединиц не влияет на свойства фермента, следует полагать, что нековалентные взаимодействия фермента с матрицей носителя существенно не отражаются на структуре и функции фермента. Следует также отметить, что, согласно полученным результатам, фосфопиридоксильное производное глутаматдегидрогеназы в иммобилизованном состоянии полностью имитирует иммобилизованную форму нативного фермента. На основании проведенных исследований можно заключить, что радиоактивная форма фосфопиридоксильного производного глутаматдегидрогеназы, иммобилизованная на сефарозе CL-4B посредством вовлечения в ковалентную связь с носителем одной из субъединиц, может служить удобной моделью для изучения структурно-функциональных особенностей каталитически активного гексамера глутаматдегидрогеназы.

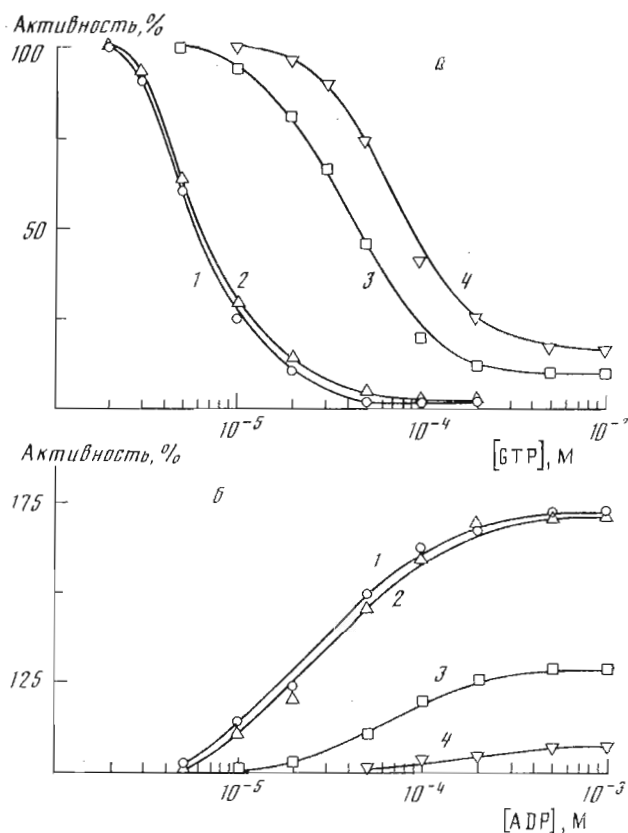


Рис. 2. Зависимости активностей растворимого и иммобилизованных фосфопиридоксильных производных глутаматдегидрогеназы от концентраций ГТР (а), АДР (б): 1 — растворимое производное фермента; 2, 3 и 4 — производные глутаматдегидрогеназы, иммобилизованные посредством вовлечения в ковалентную связь с носителем 1,0; 1,7 и 2,4 субъединиц соответственно

Экспериментальная часть

В работе использовали следующие реактивы: NADH, 2-оксоглутарат, β -меркаптоэтанол (Sigma, США), ГТР, АДР, пиридоксаль-5'-фосфат (Serva, ФРГ), EDTA (Reanal, Венгрия), BrCN, полистиленгликоль 20 000 (Merck, ФРГ), NaBH_4 (Koch-Light Laboratories Ltd., Англия), $\text{NaB}^{(3)\text{H}}_4$ (удельная радиоактивность 205 мКи/мг, Amersham, Англия). Остальные реактивы — отечественного производства, квалификация осл.

Глутаматдегидрогеназу из печени быка (*L*-глутамат: NAD(P)-оксидоредуктаза, КФ 1.4.1.3) (уд. акт. 34 ед/мг белка: за 1 ед. акт. принято количество белка, которое катализирует превращение 1 мкмоль NADH в 1 мин в процессе реакции восстановления 2-оксоглутарата) выделяли по методу, описанному ранее [14].

Фосфопиридоксильное производное глутаматдегидрогеназы, не обладающее способностью к полимеризации, получали аналогично методу, описанному ранее [13]. Глутаматдегидрогеназу (5 мг/мл) инкубировали 30 мин при 25°С в 0,1 М калий-фосфатном буфере, рН 8,0, содержащем $2 \cdot 10^{-3}$ М пиридоксаль-5'-фосфат, $2 \cdot 10^{-3}$ М ГТР, 10^{-3} М NADH и 10^{-1} М 2-оксоглутарат. Затем в инкубационную смесь добавляли 10-кратный (по отношению к пиридоксаль-5'-фосфату) мольный избыток NaBH_4 . Низкомолекулярные компоненты реакции удаляли гель-хроматографией на колонке с сефардексом G-25 с последующим диализом против 1000-кратного объема 0,1 М калий-фосфатного буфера, рН 7,2, при 4°С. Для получения радиоактивного фосфопиридоксильного производного глутаматдегидрогеназы вместо NaBH_4 использовали $\text{NaB}^{(3)\text{H}}_4$. Удельная радиоактивность полученного фосфопиридоксильного производного фермента составляла 25 мКи/мг белка.

Активация сефарозы CL-4B. Сефарозу суспендировали в воде при рН 11 из расчета 1 мл геля на 3 мл суспензии. К суспензии по каплям добавляли 0,5 объема свежего раствора BrCN в воде из расчета 2,5 — 100 мг на 1 мл осевшего геля. рН суспензии поддерживали в интервале 10,5—11,0 с помощью 0,5 М NaOH. После непрерывного перемешивания в течение 15 мин при 4°С суспензию последовательно

промывали 10 объемами 0,1 М NaHCO₃, водой и 0,1 М калий-фосфатным буфером, pH 7,2.

Иммобилизация глутаматдегидрогеназы на сефарозе CL-4B. ВгCN-активированную сефарозу суспендировали в 1 объеме 0,1 М калий-фосфатного буфера, pH 7,2, содержащего 0,6–2,5 мг/мл глутаматдегидрогеназы. Суспензию инкубировали 2,5 ч при 25°С при непрерывном перемешивании. После окончания инкубации суспензию промывали 0,1 М калий-фосфатным буфером, pH 7,2, до полного исчезновения ферментативной активности в фильтрате. Гель ресуспендировали в 1 объеме 0,1 М раствора глицина в том же буфере. Через 2 ч инкубации при непрерывном перемешивании сефарозу отмывали 0,1 М калий-фосфатным буфером, pH 7,2, содержащим 10⁻² М β-меркаптоэтанол и 10⁻³ М EDTA.

Концентрацию глутаматдегидрогеназы в растворе определяли спектрофотометрически, принимая коэффициент поглощения при 280 нм равным 0,97 (см·мг/мл)⁻¹ [15]. Содержание белка в образцах иммобилизованных глутаматдегидрогеназ определяли либо спектрофотометрированием суспензий гелей в растворах полиэтиленгликоля, как это описано в работах [16, 17], либо модифицированным методом Лоури [16]. В случае иммобилизации радиоактивного фосфопиридоксильного производного глутаматдегидрогеназы содержание белка на 1 мл осевого носителя определяли по радиоактивности геля, сравнивая ее с удельной радиоактивностью растворимого препарата фермента.

Активность растворимых и иммобилизованных препаратов глутаматдегидрогеназы определяли по скорости изменения экстинкции NADH при 340 нм в процессе реакции восстановительного аминирования 2-оксоглутарата. Концентрации реагентов в реакционной смеси были следующими: 10⁻⁴ М NADH, 5·10⁻³ М 2-оксоглутарат и 5·10⁻² М NH₄Cl. Для определения активности растворимого фермента измерения проводили в кювете 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 1–2 мкг фермента. Для определения активности иммобилизованных препаратов фермента к 4 мл реакционной смеси добавляли 5–200 мкг геля сефарозы, содержащего 0,5–2 мкг белка (в зависимости от образца иммобилизованного препарата), и непрерывно перемешивая, инкубировали при 25°С в течение различных интервалов времени (до 5 мин). По окончании инкубации раствор отфильтровывали и определяли экстинкцию NADH в фильтрате.

Радиоактивность измеряли в сцинтиляторе Брея [18] на счетчике SL-4221 (Франция).

Число субъединиц гексамера глутаматдегидрогеназы, вовлекаемых в ковалентную связь с носителем, определяли исходя из содержания белка на сефарозе после ее обработки 8 М мочевиной. С этой целью гель суспендировали в 0,1 М калий-фосфатном буфере, pH 7,2, содержащем 8 М мочевины, 5·10⁻² М β-меркаптоэтанол и 10⁻³ М EDTA, и инкубировали при непрерывном перемешивании в течение 1 ч при 25°С. После окончания инкубации гель последовательно промывали 5 объемами инкубационной смеси и 10 объемами 0,01 М калий-фосфатного буфера, pH 7,2.

ЛИТЕРАТУРА

1. Муронц В. И., Наградова Н. К. Иммобилизованные олигомерные ферменты. М.: Наука, 1984.
2. Можаяв В. В. // Успехи биол. химии. 1983. Т. 24. С. 99–134.
3. Gabel D. // Eur. J. Biochem. 1973. V. 33. № 2. P. 348–356.
4. Муронц В. И., Головина Т. О., Наградова Н. К. // Биохимия. 1982. Т. 47. № 1. С. 3–12.
5. Nagradova N. K., Golovina T. O., Mevkh A. T. // FEBS Lett. 1974. V. 49. № 2. P. 242–245.
6. Carvajal N., Martinez J., Fernandez H. // Biochim. et biophys. acta. 1977. V. 481. № 1. P. 177–183.
7. Carvajal N., Martinez J., De Oca F. M., Rodriguez J., Fernandez M. // Biochim. et biophys. acta. 1978. V. 527. № 1. P. 1–7.
8. Aquirre R., Kasche V. // Eur. J. Biochem. 1983. V. 130. № 2. P. 373–381.
9. Kochetov G. A., Solovieva O. N. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1978. V. 84. № 2. P. 515–519.
10. Eisenberg H., Tomkins G. M. // J. Mol. Biol. 1968. V. 31. № 1. P. 37–49.
11. Moon K., Smith E. L. // J. Biol. Chem. 1973. V. 248. № 9. P. 3082–3088.
12. Markau K., Schneider J., Sund H. // Eur. J. Biochem. 1971. V. 24. № 2. P. 393–400.
13. Агаджанян С. А., Погосян А. А., Карабашян Л. В. // Молекуляр. биология. 1986. Т. 20. № 3. С. 737–744.
14. Агаджанян С. А., Арутюнян А. А., Карабашян Л. В. // Биооргани. химия. 1984. Т. 10. № 9. С. 1171–1176.
15. Olson J. A., Anfinsen C. B. // J. Biol. Chem. 1952. V. 197. № 1. P. 67–79.
16. Golovina T. O., Cherednikova T. V., Mevkh A. T., Nagradova N. K. // Anal. Biochem. 1977. V. 83. № 2. P. 778–781.
17. Муронц В. М., Чередникова Т. В., Наградова Н. К. // Биохимия. 1981. Т. 46. № 10. С. 1731–1739.
18. Bray G. A. // Anal. Biochem. 1960. V. 1. № 1. P. 279–285.

STRUCTURAL ORGANIZATION OF HEXAMER OF GLUTAMATE
DEHYDROGENASE.

1. ENZYME IMMOBILIZED ON SEPHAROSE AS A MODEL
FOR INVESTIGATION OF STRUCTURAL AND FUNCTIONAL PROPERTIES
OF GLUTAMATE DEHYDROGENASE

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

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

Bovine liver glutamate dehydrogenase (*L*-glutamate-NAD(P)-oxidoreductase, EC 1.4.1.3) and its radioactive phosphopyridoxyl derivative were covalently immobilized on Sepharose CL-4B with different degrees of cyanogen bromide activation. The catalytic and regulatory properties of the immobilized samples of the enzymes were studied. It was shown that the enzymes were immobilized through a single subunit of hexamer when sepharose was activated by small amounts of cyanogen bromide (less than 5 mg per 1 ml of gel). In this case, the immobilization did not alter the catalytic and regulatory properties of glutamate dehydrogenase. The immobilized radioactive phosphopyridoxyl derivative of glutamate dehydrogenase completely imitated the immobilized native enzyme and can be used as a convenient model for structural and functional investigation of catalytically active hexamer of glutamate dehydrogenase.