ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ ՀԱՆԴԵՍ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ АРМЕНИИ
XXXI, 6, 1978

УДК 616.153.1:577.158.347

# ВЛИЯНИЕ МОЧЕВИНЫ НА КОНФОРМАЦИЮ И КАТАЛИТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ГЛУТАМАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ

Л. В. КАРАБАШЯН, Н. Г. ЭКИЗЯН, С. Г. МОВСЕСЯН

Изучено влияние мочевины на конформационные состояния и каталитическую активность глутаматдегидрогеназы (ГДГ). Методом кругового дихроизма показано, что взаимодействие фермента с коферментами и субстратами практически не отражается на устойчивости ГДГ в отношении денатурирующего действия мочевины. Инактивация фермента под влиянием мочевины происходит в 2 стадии: первая является обратимой и не сопровождается изменением вторичной структуры ГДГ, вторая представляет собою необратимый процесс и является следствием денатурации ГДГ. Исследование некоторых физико-химических и каталитических характеристик фермента в присутствии мочевины показало, что обратимая инактивация ГДГ происходит в результате влияния мочевины на каталитический центр фермента.

Согласно представлениям Тенфорда [1], денатурация белков под действием мочевины может быть представлена как динамическое равновесие между нативной (N) и денатурированными (Д) формами фермента, не обладающими каталитической активностью. Однако потеря ферментом каталитической активности может предшествовать критическому конформационному переходу N—Д, вызванному действием денатурирующего агента, как это наблюдалось на ряде ферментов под влиянием нейтральных солей [2]. Такого рода эффекты могут быть обусловлены тем, что область активного центра фермента не вовлекается в систему кооперативных связей, поддерживающих упорядоченную конформацию белковой глобулы в целом. В этом случае структура активного центра фермента может принимать участие в флуктуациях локального характера, которые отражаются на функциях фермента, но не затрагивают конформацию макромолекулы в целом.

Настоящая работа посвящена изучению влияния мочевины на конформационные состояния и каталитические свойства ГДГ с целью выяснения некоторых сторон механизма инактивации этого фермента.

ГДГ катализирует обратимую реакцию окислительного дезаминирования глутамата с образованием α-кетоглутарата и аммиака. Минимальная по молекулярному весу каталитически активная единица фермента представляет собою олигомер, состоящий из шести идентичных протомеров с молекулярным весом 56000 [3]. В зависимости от условий среды (температура, ионная сила, концентрация) олиго-

меры ГДГ способны ассоциировать в линейные полимеры с молекулярным весом до $2\times10^6$ [4]. При этом наблюдается прямая корреляция между молекулярным весом ассоциата, его удельной активностью и специфичностью [4, 5]. Для исключения влияния ассоциации гексомеров ГДГ на исследуемые свойства эксперименты проводили на уровне олигомеров. В соответствии с поставленной целью концентрация ГДГ не превышала $5\times10^{-7}$ М, при которой равновесие между ассоциированной формой олигомеров и индивидуальными олигомерами резко сдвинуто в сторону последнего [4].

*Материал и методика.* Использовали кристаллический препарат ГДГ фирмы «Fluka» (Швейцария), суспензированный в насыщенном растворе сульфата аммония, который перед употреблением центрифугировали и очищали от низкомолекулярных соединений на колонке $1\times20$ см сефадекса G-25. Дифосфопиридиннуклеотид в окисленной и восстановленной формах (НАД и НАДН), $\alpha$-кетоглутарат ($\alpha$-КГ), глутамат, хлористый аммоний и мочевину производства «Sigma» (США) применяли без дополнительной очистки.

Концентрацию реагентов определяли спектрофотометрически, используя следующие молярные коэффициенты экстинкции при нейтральных значениях pH: $E_{280\ нм}=52000$ [6]; $\varepsilon_{340\ нм}=6200$ и $\varepsilon_{260\ нм}=17400$ [7] для протомеров ГДГ, НАДН и НАД соответственно, а концентрацию мочевины—с помощью рефрактометра ИРФ-22. Степень денатурации фермента под действием мочевины определяли по уменьшению амплитуды кругового дихроизма (КД) при 223нм (в области поглощения пептидных связей в $\alpha$-спиральной конформации). В качестве показателя степени денатурации использовали параметр $[\theta]_м/[\theta]_0$, где $[\theta]_0$—эллиптичность ГДГ в буферном растворе, а $[\theta]_м$— эллиптичность в растворе мочевины с молярной концентрацией М.

Спектры КД снимали на дихрографах «Russel-Jouan II» или «Jobin—Jvon III» при чувствительности $10^{-5}$ и $5\times10^{-6}$ соответственно. Поглощение исследуемых образцов не превышало 1,5 о. е. В зависимости от концентрации длину оптического пути образцов варьировали от 0,5 см до 2 см. Разностные спектры поглощения снимали, используя прецезионную шкалу 0,—0,1 или 0—0,5 о. е. спектрофотометра Cary—118 с помощью тандемной схемы из кювет с длиной оптического пути 1,000 см.

Константу диссоциации комплексов ГДГ с НАД и НАДН определяли по следующему соотношению:

$$\Delta A=\Delta\varepsilon\times\frac{Kd+[E]+[L]-\sqrt{(Kd+[E]+[L])^2\times4[E][L]}}{2},$$

где $\Delta A$—разностная оптическая плотность, Kd—константа диссоциации, [E] и [L]—тотальные концентрации фермента и лиганда соответственно и $\Delta\varepsilon$—молярный коэффициент разностной экстинкции. При определении Kd конечная концентрация фермента в смеси с лигандом, в отличие от остальных экспериментов, составляла $10^{-5}$ М.

Начальные скорости реакции восстановительного аминирования $\alpha$-КГ и окислительного дезаминирования глутамата определяли по изменению экстинкции в максимуме поглощения НАДН (340 нм), используя шкалу 75—125% или 100—80% спектрофотометра «Specord» в течение 1—2 мин после начала реакции. Измерения активности проводили в кювете с длиной оптического пути 1 см в объеме 2 мл. Концентрации реагентов в реакционной смеси составляли (мМ): ГДГ—0,07; НАДН—0,1; $\alpha$-КГ—5; $NH_4Cl$—50, или НАД—0,5 и глутамата—2,5. В зависимости от поставленной цели реакцию инициировали добавлением фермента или субстрата. Все измерения были проведены в 0,1 М К-фосфатном буфере при pH 7,3.

*Результаты и обсуждение.* На рис. 1 А приведены спектры КД ГДГ в 0,1 М К-фосфатном буфере и в буферных растворах, содержащих мочевину. Спектр КД фермента в буферном растворе характери-

зуется отрицательным дихроизмом с максимумом при 223 нм и эллиптичностью $[\Theta]_{223} = 1{,}3 \times 10^4$ град. см$^2$ дециомоль$^{-1}$. Согласно данным Уэльса [8], наблюдаемая эллиптичность обусловлена тем, что около 43% полипептидной цепи находится в α-спиральной конформации.

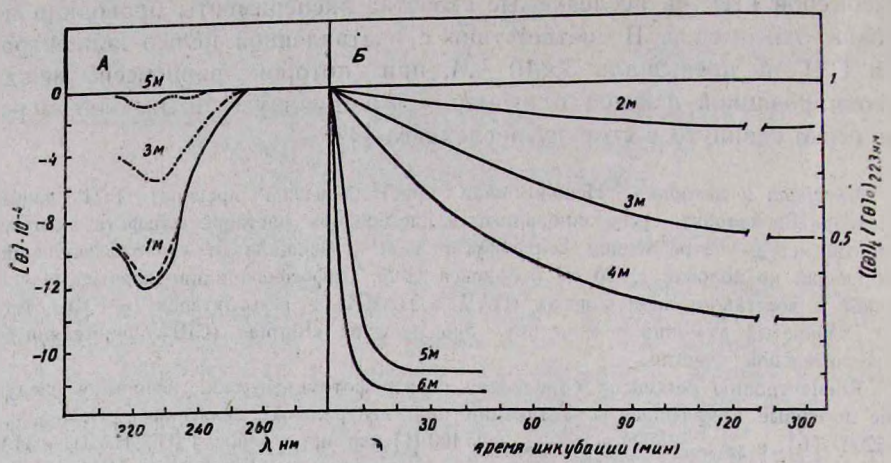


Рис. 1. А—спектры КД ГДГ в 0,1 М К-фосфатном буфере (—) и в буферных растворах, содержащих различные концентрации мочевины. Б—зависимость изменения амплитуды КД ГДГ от времени инкубации в растворах с различной концентрацией мочевины (t=25°).

Из того же рисунка видно, что добавление в раствор ГДГ мочевины приводит к уменьшению величины $[\Theta]_{223}$, что свидетельствует о денатурации нативной конформации фермента параллельно увеличению концентрации мочевины. Как было отмечено, реакция денатурации при любой концентрации мочевины может быть представлена в виде равновесия между нативной и денатурированной формами фермента ($N \rightleftarrows D$), которое достигает стационарного состояния, как правило, в течение нескольких часов [1].

Время, необходимое для установления равновесия зависит от концентрации мочевины и варьирует от нескольких часов для растворов, содержащих не более 4 М мочевины, до 5—10 мин для растворов, содержащих 5 М мочевины и выше (рис. 1 Б).

С учетом этих данных методом КД была получена кривая изотермической денатурации ГДГ под влиянием мочевины (рис. 2). Из рисунка видно, что денатурация фермента носит кооперативный характер, происходит в интервале 2 М—4 М мочевины и характеризуется точкой полуденатурации $C_0 = 3{,}2$ М.

Исходя из упомянутой схемы равновесия между двумя состояниями ($N \rightleftarrows Д$), следовало ожидать, что то же действие мочевины проявится также и на каталитической активности фермента. Однако из приведенной на рис. 3б зависимости относительной активности ГДГ (в реакции восстановительного аминирования α-КГ) от концен-

трации мочевины видно, что в отличие от денатурации ГДГ инактивация происходит в интервале 0,5—3 М мочевины, а точка полуинактивации соответствует 2 М мочевины.

Наблюдаемые различия могут быть связаны с тем, что устойчивость ГДГ к денатурационному действию мочевины может изменять-

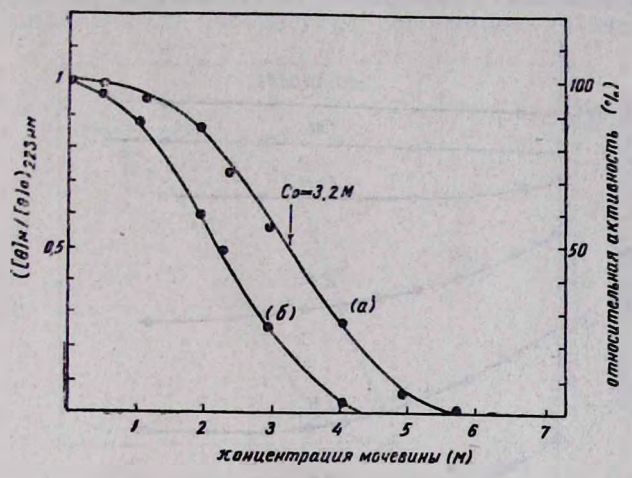


Рис. 2. Кривая изотермической денатурации ГДГ под действием мочевины (а). Относительное изменение начальной скорости восстановительного аминирования α-КГ в зависимости от концентрации мочевины (б).

ся при взаимодействии с коферментом и субстратами, присутствующими в реакционной смеси, как это наблюдалось в случае аспартатаминотрансферазы [9]. Однако из табл. 1, в которой приведены зна-

Таблица 1

Значения точек полуденатурации ГДГ в присутствии некоторых специфических лигандов

(концентрация ГДГ $1{,}3\times10^{-7}$ М)

| ГДГ + лиганды | Концентрация лигандов в смеси, М | Точка полуденатурации $-C_0$, М мочевины |
|---|---|---|
| ГДГ | — | 3,2±0,1 |
| ГДГ + НАДН | $10^{-3}$ | 3,2±0,3 |
| ГДГ + НАД | $10^{-3}$ | 3,2±0,3 |
| ГДГ + α − КГ | $10^{-3}$ | 3,2±0,2 |
| ГДГ + глутамат | $10^{-3}$ | 3,2±0,3 |
| ГДГ+НАДН+глутамат | $5\times10^{-4}$ | 3,2±0,3 |

чения точек полуденатурации Со для ГДГ в присутствии различных коферментов и субстратов, видно, что взаимодействие фермента с лигандами, присутствующими в реакционной смеси, практически не сказывается на его стабильности к денатурационному воздействию

мочевины. Сравнивая данные по денатурации и инактивации ГДГ под влиянием мочевины, можно прийти к заключению, что инактивация фермента предшествует (в шкале концентрации мочевины) его денатурации.

При концентрациях мочевины 2 М и выше потеря ферментом каталитической активности происходит в 2 стадии (рис. 3). Первая стадия

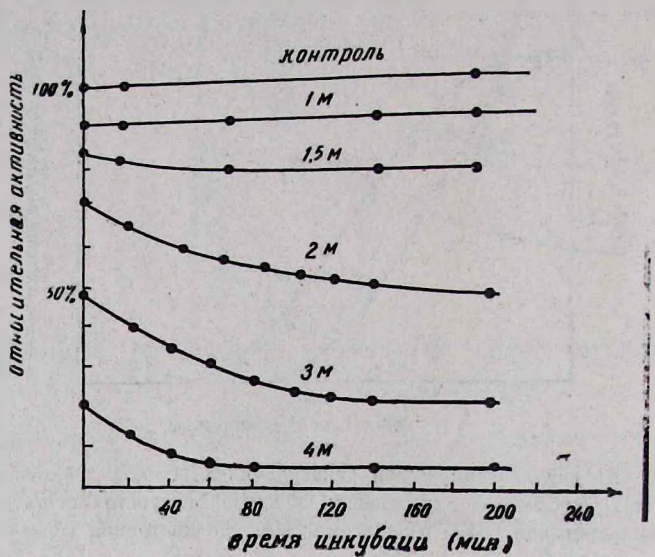


Рис. 3. Зависимость инактивации ГДГ от времени инкубации фермента в растворах с различной концентрацией мочевины.

характеризуется высокой скоростью и заканчивается в течение времени, не подающемуся регистрации используемым методом, вторая— представляет собою медленный процесс, достигающий равновесия в интервале времени, совпадающем со временем установления $N \rightleftarrows Д$ (рис. 1Б) и, следовательно, представляет собою инактивацию ГДГ в результате его денатурации. Этот вывод подтверждается тем фактом, что при концентрациях мочевины ниже 2 М, при которых денатурация ГДГ не имеет места, наблюдается только одна стадия инактивации, характеризующаяся высокой скоростью. Следует также отметить, что удаление мочевины из растворов фермента методом диализа приводит к полному восстановлению ферментативной активности, если концентрация мочевины не превышает 2 М. Диализ растворов ГДГ в 3 М мочевине приводит к восстановлению активности всего до 50% от активности нативного фермента. Иными словами, инактивация ГДГ, наблюдаемая на 1-й стадии, представляет собой полностью обратимый процесс, в то время как на 2-й стадии она является необратимой. Это дополнительное свидетельство того, что вторая стадия инактивации фермента является следствием его денатурации.

На рис. 4а приведена зависимость активности фермента от концентрации мочевины, отражающая только первую стадию инактивации, для получения которой ферментативную реакцию инициировали добавлением фермента в реакционную смесь, содержащую мочевину. В этих условиях фермент практически не инкубирован в растворах мочевины. На том же рисунке (рис. 4б) дана зависимость амплитуды КД ГДГ при 223 нм от концентрации мочевины, полученная в ана-

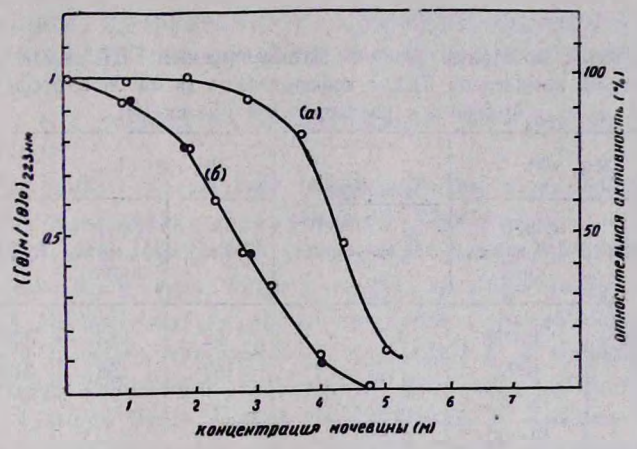


Рис. 4. а—кривая изотермической денатурации ГДГ, б—зависимость изменения начальной скорости реакции восстановительного аминирования $\alpha$-КГ (О) и окислительного дезаминирования глутамата (●) от концентрации мочевины в условиях, исключающих денатурацию фермента в мочевине.

логичных условиях, исключающих денатурацию фермента мочевиной. Из приведенных данных видно, что вплоть до 4 М концентрации мочевины ГДГ сохраняет вторичную структуру, несмотря на то, что ферментативная активность падает более чем на 90% от исходной. Следовательно, денатурация глобулы ГДГ не является необходимым условием для потери ферментом каталитической активности, хотя, как это видно из рис. 3, денатурация вносит определенный вклад в инактивацию образцов ГДГ, инкубированных в растворах мочевины в течение 3 час. и более. Из рис. 4 видно, что этот вклад не превышает 40% от общей инактивации в 3 М мочевине и практически достигает нуля при повышении или понижении концентрации мочевины в реакционной смеси.

Следовательно, основная причина инактивации ГДГ мочевиной не связана с денатурационными эффектами и, по всей вероятности, вызвана локальными нарушениями конформации активного центра фермента. Одним из путей инактивирующего действия мочевины могут быть локальные нарушения, затрагивающие контактные участки фермента, которые обеспечивают специфическое связывание коферментов и субстратов. Другой возможной причиной ингибирования ГДГ мочевиной могут быть нарушения, затрагивающие каталитический центр

фермента. Для выяснения этих вопросов было изучено влияние мочевины на спектральные характеристики и константу диссоциации комплексов ГДГ с НАД и НАДН, а также исследована кинетика реакций восстановительного аминирования α-КГ и окислительного дезаминирования глутамата в присутствии 3 М мочевины.

В табл. 2 приведены величины кинетических констант (Км и $k_{кат.}$) в реакциях, катализируемых ГДГ, а также значения констант

Таблица 2

Кинетические константы реакций, катализируемых ГДГ, и константы диссоциации комплексов ГДГ с коферментами (в 0,1 М К-фосфатном буфере и в растворах 3М мочевины)

| Лиганд | Км, мМ | | $k_{кат.}$ буфер | $10^6 \cdot Kd$, М | | Δε (260нм—285нм), $М^{-1}$ $см^{-1}$ | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | буфер | буфер + 3М мочевина | $k_{кат.}$ (буфер + 3М мочевина) | буфер | буфер + 3М мочевина | буфер | буфер + 3М мочевина |
| НАДН | 0,040 | 0,038 | 2,5 | 62 | 83 | 3200 | 2800 |
| НАД | 0,12 | 0,11 | 2,5 | 163 | 152 | 3100 | 3200 |
| α—КГ | 2,5 | 3 | 2,5 | — | — | — | — |
| глутамат | 9,5 | 10—11 | 2,5 | — | — | — | — |
| $NH_4^+$ | 3 | 6—7 | 2,5—3 | — | — | — | — |

Значения Км и $k_{кат.}$ определены по методу Лайнуивера и Берка [10].

диссоциации К и амплитуды разностных спектров поглощения (Δε) для комплексов ГДГ с коферментами. Из приведенных данных видно, что присутствие мочевины практически не влияет ни на величину Kd, ни на значение (Δε) для двойных комплексов ГДГ с НАД или НАДН (измерения амплитуды разностных спектров проводили в течение не более 10 мин после смешения фермента и мочевины, т. е. в условиях, когда денатурацией фермента под влиянием 3 М мочевины можно пренебречь, рис. 1 Б). Кроме того, константа Михаелиса (Км) ни для одного из лигандов не претерпевает существенных изменений в присутствии 3 М мочевины. Исключение составляет величина Км для иона $NH_4+$, которая изменяется примерно в 2 раза. Однако такое изменение этой величины не является достаточным для объяснения наблюдаемой инактивации ГДГ. Это утверждение основано на том факте, что инактивирующее действие мочевины на ГДГ в реакции восстановительного аминирования α-КГ совпадает с аналогичной зависимостью в реакции окислительного дезаминирования глутамата (рис. 4б).

Следовательно, полученные результаты свидетельствуют о том, что инактивация фермента под действием мочевины не является следствием изменения характера взаимодействия ГДГ с коферментом и с субстратами.

Вместе с тем, существенное влияние мочевины на величину $k_{кат.}$ (табл. 2) указывает на то, что ингибирование происходит в результате нарушений, происходящих в каталитическом аппарате ГДГ.

Институт биохимии
АН АрмССР

Поступило 1.III 1978 г.

## ՄԻԶԱՆՅՈՒԹԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ԳԼՅՈՒՏԱՄԱՏԴԵՀԻԴՐՈԳԵՆԱԶԱՅԻ ԿՈՆՖՈՐՄԱՑԻՈՆ ԵՎ ԿԱՏԱԼԻՏԻԿ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՎՐԱ

Լ. Վ. ԿԱՐԱԲԱՇՅԱՆ, Ն. Գ. ԷՔԻԶՅԱՆ, Ս. Գ. ՄՈՎՍԻՍՅԱՆ

*Ուսումնասիրվել է միզանյութի ազդեցությունը գլյուտամատդեհիդրոգենազայի (ԳԴՀ) և սպեցիֆիկ լիգանդների (կոֆերմենտներ և սուբստրատներ) հետ նրա կազմած կոմպլեքսների կատալիտիկ հատկությունների և կոնֆորմացիոն կայունության վրա։ Ցույց է տրվել, որ միզանյութի ազդեցության ներքո ԳԴՀ-ի ինակտիվացումը ընթանում է երկու փուլով։ Առաջին փուլում այն ընթանում է բարձր արագությամբ, դարձելի է և չի ուղեկցվում սպիտակուցի գլոբուլայի կանոնավոր երկրորդային կառուցվածքի հալմամբ։ Ինակտիվացիայի երկրորդ փուլը իրենից ներկայացնում է դանդաղ պրոցես, որը հետևանք է ֆերմենտի գլոբուլայի դենատուրացման՝ միզանյութի ազդեցությամբ։*

*ԳԴՀ-ի կատալիտիկ և ֆիզիկա-քիմիական հատկությունների ուսումնասիրությունը ցույց է տվել, որ միզանյութի ներկայությամբ գործնականորեն չի փոփոխվում ֆերմենտի հետ կոֆերմենտների և սուբստրատների փոխազդեցության բնույթը։ ԳԴՀ-ի ինակտիվացման առաջին փուլը տեղական խանգարումների հետևանք է, որոնք շոշափում են ֆերմենտի կատալիտիկ կենտրոնը։*

## ACTION OF UREA ON CONFORMATION AND ENZYMATIC ACTIVITV OF GLUTAMINASE DEHYDROGENASE

L. V. KARABASHIAN, N. G. EKIZIAN, S. G. MOVSESSIAN

The influence of urea on conformation and enzymatic activity of glutamate dehydrogenase (GDH) has been studied. By using the method of circular dichroism it has been shown that the interaction of enzyme with coenzymes and substrates does not influence the stability of GDH to denaturating action of urea. The inactivation of enzyme under the influence of urea is a two-stage process. The first stage is reversible and is not accompanied by changes of the regular structure of GDH. The second stage is irreversible and is a result of denaturation of GDH. The investigation of some physico-chemical and catalitical properties of ensyme in the presence of unea has shown that reversible inactivation og GDH is a result of urea action on the catalitical site of the enzyme.

## ЛИТЕРАТУРА


1. *Tenford Ch.* Adv. Prot. Chem. *23*, 121 1968.
2. *Warren I. C., Cheatum S. G.* Biochemistry, *5*, 1702, 1966.
3. *Moon K., Piszkiewicz, Smith E. L.* Proc. Natl Acad. Sci USA, *69*, 1380, 1972.
4. *Gauper F. P., Mafkau K., Sund H.* Eur. J. Biochem., *49*, 555, 1974.
5. *Dessen P., Pantaloni D.* Eur. J. Biochem. *39*, 157, 1973.
6. *Egan R. R., Dalzel K.* BBA. *250*, 4750, 1971.
7. *Beaucamp K., Bergmeyer U. H., Grabl M.* In Methoden der enzymatichen analyse (H. E. Bergmeyer, ed., 2nd. ed., Band I. Verlag Chemie. Weinheim), 1970.
8. *Wells B. D.* J. Mol. Biol. *97*, 391, 1975.
9. *Ivanov V. I., Bocharov A. L., Volkenstein M. V., Karpetsky M. Ya., Mora S., Okina E. L., Yudina L. V.* Eur. J. Biochem. *40*, 519, 1973.
10. *Lineweaver H., Birk D. I.* J. Amer. Chem. Soc. *56*, 658, 1934.