

УДК 577.158

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

К. В. Даноян, С. А. Агаджанян, С. Г. Аветисян, Л. В. Карабашян

Модификация глутаматдегидрогеназы печени быка
1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимидом

(Представлено чл.-корр. АН Армянской ССР К. Г. Карагесяном 11/IV 1988)

Карбодимиды, в особенности их водорастворимые формы, в последнее время широко используются для химической модификации карбоксильных групп остатков аспарагиновой и глутаминовой кислот в белках и ферментах (¹⁻⁷). Карбодимид, взаимодействуя с протонированной карбоксильной группой, приводит к образованию O-ацилизомочевины, которая, будучи нестабильным соединением, либо изомеризуется до N-ацилмочевины, либо в присутствии нуклеофильных агентов взаимодействует с ними, высвобождая при этом мочевины (¹⁻⁸). Следует отметить, что образующаяся N-ацилмочевина крайне неустойчива в щелочных средах. Вследствие этого при мягкой щелочной обработке происходит регенерация модифицированных карбоксильных групп белка (¹). При химической модификации белков и ферментов следует также учитывать, что карбодимиды в определенных условиях могут взаимодействовать и с SH-группами остатков цистеинов (⁹), а также с OH-группами остатков тирозинов (¹⁰). Однако образующиеся при этом продукты реакции, в отличие от N-ацилмочевины, стабильны в щелочных средах (¹⁻⁸). Использование в качестве модифицирующих реагентов карбодимидов позволило выявить участие карбоксильных групп в функционировании некоторых ферментов, в частности, цитохром C оксидазы (⁴), митохондриальной АТФазы (³), различных аминоацил-тРНК-синтетаз (⁵⁻⁶), креатинкиназы (⁷).

В настоящем сообщении приведены данные по результатам изучения модификации глутаматдегидрогеназы (ГДГ) водорастворимым карбодимидом 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимидом (далее—карбодимид), которое проводили с целью выяснения роли некоторых групп этого фермента в его функционировании.

ГДГ из печени быка получали по ранее описанному методу (¹¹). Ферментативную активность определяли по изменению экстинкции в полосе поглощения кофермента (340 нм) в условиях, описанных в работе (¹²). Модификацию ГДГ карбодимидом проводили в 0,1 М MOPS/KOH или HEPES/KOH буферах, содержащих 0,1 М NaCl.

На рис. 1, а и б показаны кинетические зависимости активности ГДГ от времени инкубации в растворах с различной концентрацией карбодимида при pH 5,5 и аналогичные зависимости при инкубации

фермента в растворах, содержащих 50 мМ карбодимид при различных рН. Как видно из приведенных данных, взаимодействие ГДГ с карбодимидом сопровождается инактивацией фермента. Анализ этих данных в полулогарифмических координатах показал, что процесс инактивации подчиняется кинетике псевдо-первого порядка и константа

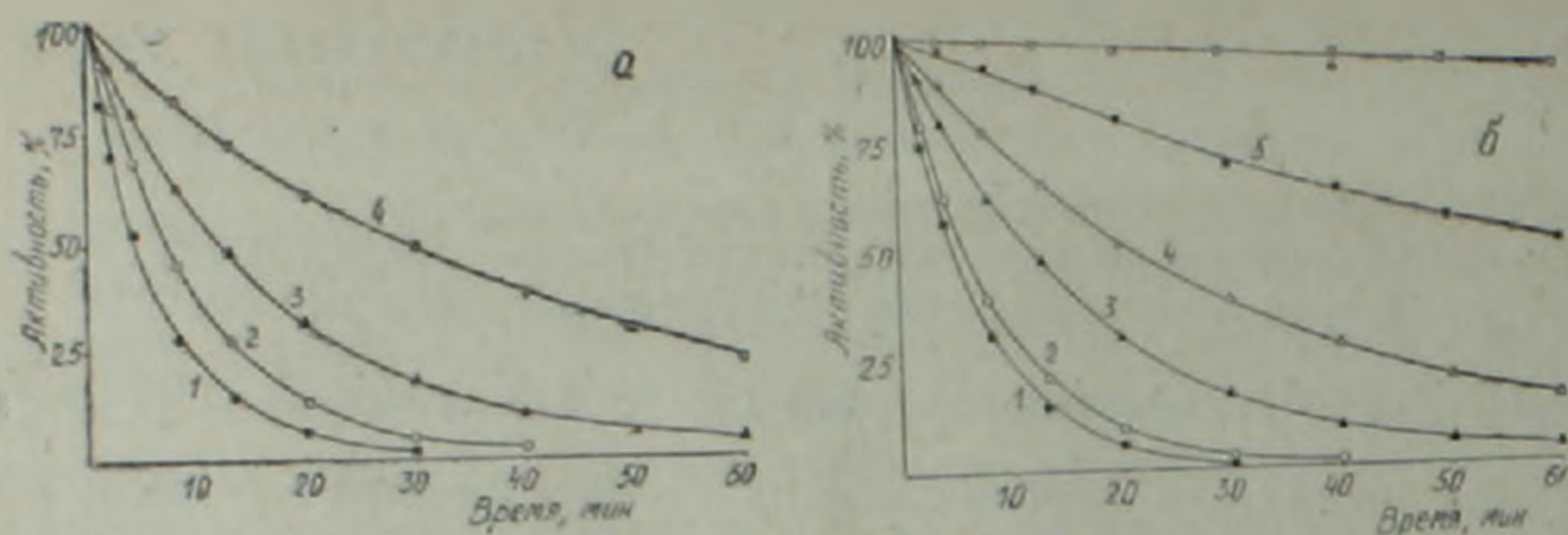


Рис. 1. а) Кинетика инактивации ГДГ при инкубации в растворах, содержащих различные концентрации карбодимида (мМ): 1—170, 2—100; 3—50; 4—20; рН инкубационной смеси 5,5.

б) Аналогичные зависимости при варьировании рН инкубационной смеси: 1—5,0; 2—5,2; 3—5,5; 4—5,7; 5—6,0; 6—6,5; концентрация карбодимида—50 мМ. Концентрация ГДГ—0,5 мг/мл, температура инкубации 25°C

скорости инактивации повышается с повышением концентрации карбодимида и понижением рН инкубационной среды. Порядок реакции по концентрации ингибитора, оцененный по методу (¹³), при различных рН варьирует в пределах 0,85—1,05, что позволяет предположить, что инактивация фермента обусловлена модификацией единственной группы ГДГ. Как показало изучение рН-зависимости константы скорости инактивации, кажущаяся рК инактивации не превышает 5,5. Это обстоятельство указывает на то, что карбодимид взаимодействует с одной из карбоксильных групп фермента. Попытка восстановления ферментативной активности модифицированной ГДГ обработкой инкубационной смеси в слабощелочной среде (рН 9,0) не увенчалась успехом. Эти данные позволяют предположить, что образующаяся в результате реакции О-ацелизомочевина подвергается атаке внутримолекулярной нуклеофильной группой. Не исключено, что ответственной за инактивацию ГДГ является эта нуклеофильная группа фермента. Однако, как показали проведенные исследования, фермент инактивируется под влиянием карбодимида также и в присутствии экзогенного нуклеофильного агента—метилового эфира глицина (1 М). Следовательно, обсуждаемая инактивация ГДГ является следствием блокирования протонированной карбоксильной группы фермента. Следует отметить, что карбодимид в этих условиях вызывает инактивацию ГДГ как в реакциях с бикарбоксильными субстратами фермента (2-оксоглутаратом и глутаматом), так и в реакциях с монокарбоксильными субстратами (пируватом, 2-оксовалериатом, аланином и валином). Эти данные позволяют предполагать, что модифицируемая карбоксильная группа, скорее всего, принимает участие в катализе. Приведенные результаты подтверждают гипотезу, выдвинутую Райфом и Клееландом (¹⁴), согласно которой механизм реакций, катализируемых ГДГ, вклю-

чающий в себя стадию образования карбиноламина, происходит с участием карбоксильной группы фермента с pK около 5,2.

Из данных, приведенных на рис. 1, 6, видно, что при pH 6,5 и выше инкубация ГДГ с карбодимидом не приводит к заметной инактивации фермента. Однако, как это видно из данных, приведенных на рис. 2, при добавлении в реакционную смесь НАДН и 2-оксоглутарата (кофермента и субстрата) происходит инактивация фермента при значениях pH 6,5 и выше. Следует отметить, что подобный эффект не наблюдается при добавлении каждого из этих компонентов в отдельности. Анализ кинетических зависимостей (рис. 2) в полулогарифмических координатах показал, что процесс инактивации подчиняется ки-

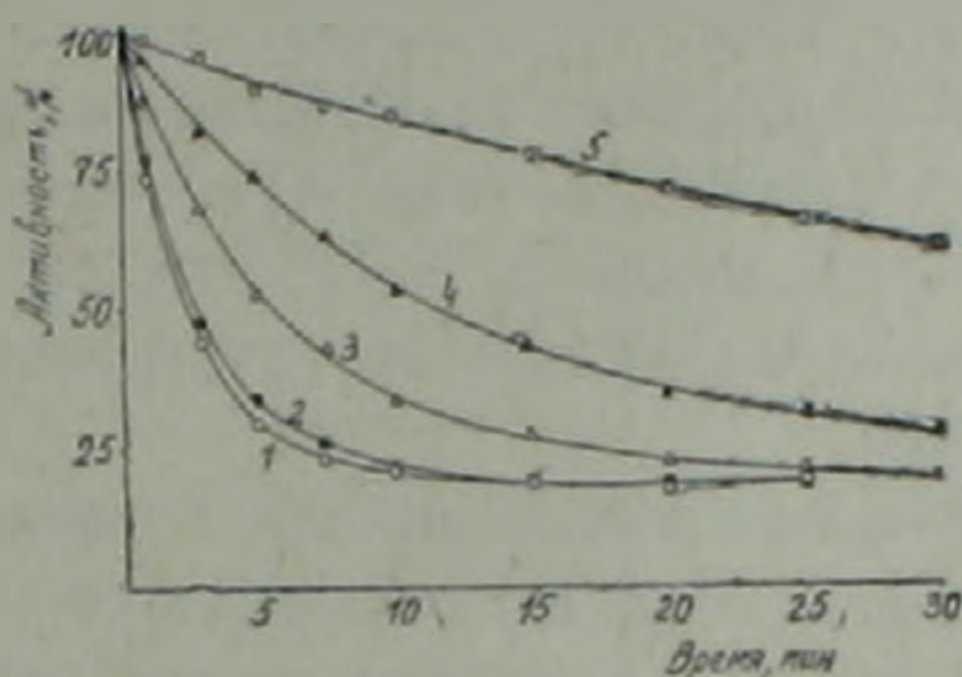


Рис. 2. Кинетика инактивации ГДГ 50 мМ карбодимидом в присутствии 0,2 мМ НАДН и 10 мМ 2-оксоглутарата при вариации pH инкубационной смеси: 1—6,5; 2—7,0; 3—7,5; 4—8,0; 5—8,5. Концентрация ГДГ—0,5 мг/мл, температура инкубации 25°C

нетике псевдо-первого порядка. Судя по pH -зависимости константы скорости инактивации ГДГ pK инактивации составляет 7,4—7,8, что позволяет предположить о взаимодействии карбодимида с SH-группой остатка цистеина или OH-группой остатка тирозина фермента. Следует отметить, что при добавлении в реакционную среду, наряду с коферментом и субстратом, метилового эфира глицина (конечная концентрация 1 М) не происходит заметной инактивации фермента. Это обстоятельство свидетельствует о том, что в отсутствие экзогенного нуклеофила активированная карбодимидом группа белка взаимодействует с внутримолекулярной нуклеофильной группой. Вследствие этого можно предположить, что инактивация фермента является следствием блокирования этой нуклеофильной группы. В связи с этим следует заметить, что 80%-ная инактивация фермента, при его обработке карбодимидом в присутствии специфических лигандов, наблюдается лишь в реакциях превращения бикарбоксильных субстратов (2-оксоглутарата и глутамата). В реакциях же превращения монокарбоксильных субстратов (пирувата, 2-оксoвалерната, аланина и валина) заметного изменения ферментативной активности не происходит. Эти данные однозначно свидетельствуют о том, что ни одна из групп, участвующих в образовании внутримолекулярной «сшивки» (группа, акти-

вируемая карбодимидом, и взаимодействующий с ней нуклеофил), непосредственного участия в катализе не принимает. Изучение каталитических характеристик ГДГ показало, что при модификации карбодимидом в присутствии НАДН и 2-оксоглутарата наряду с инактивацией фермента в реакциях превращения бикарбоксильных субстратов происходит понижение значений K_m субстратов (от 0,6 мМ до 0,2 мМ для 2-оксоглутарата и от 3,5 мМ до 1,5 мМ для глутамата). Значения же K_m коферментов (НАДН и НАД) существенных изменений не претерпевают. Эти данные, очевидно, свидетельствуют о том, что модификация ГДГ сопровождается улучшением сродства бикарбоксильных субстратов к ферменту. Этот эффект, по всей видимости, обусловлен фиксацией путем образования внутримолекулярной «сшивки» специфической конформации ГДГ, которую она приобретает при образовании тройного комплекса фермент-НАДН-2-оксоглутарат. Однако образование внутримолекулярной «сшивки» приводит также и к ограничению конформационной подвижности ГДГ, что, по всей видимости, и определяет потерю ферментом активности в реакциях превращения бикарбоксильных субстратов.

Таким образом, проведенные исследования позволили установить, что при pH ниже 6,5 карбодимид взаимодействует с карбоксильной группой ГДГ с pK ионизации $< 5,5$, принимающей участие в ферментативном катализе. В области же pH 6,5—8,5, в присутствии насыщающих концентраций НАДН и 2-оксоглутарата, карбодимид способствует образованию внутримолекулярной «сшивки», приводящей к фиксации конформации ГДГ, которую фермент приобретает при образовании Михаэлисова комплекса с коферментом и субстратом.

Институт экспериментальной
биологии Академии наук
Армянской ССР

Կ. Վ. ԴԱՆՈՅԱՆ, Ս. Ա. ԱՂԱՋԱՆՅԱՆ, Ս. Հ. ԱՂԵՏԻՍՅԱՆ, Է. Վ. ԿԱՐԱՔԱՇՅԱՆ

Գլուտամատ դեհիդրոգենազի մոդիֆիկացիան 1-էթիլ-3-(3-դիմէթիլամինոպրոպիլ)կարբոդիմիդով

Բացահայտված է, որ գլուտամատ դեհիդրոգենազի ինկուբացիան 1-էթիլ-3-(3-դիմէթիլամինոպրոպիլ)կարբոդիմիդի հետ pH-ի 6,0 և ցածր արժեքների դեպքում հանգեցնում է վերջինիս կողմից ֆերմենտի $pK < 5,5$ իոնիզացիայի արժեքով կարբոքսիլ խմբի բլոկադայի, որը մասնակցում է ֆերմենտատիվ կատալիզում: pH-ի շեղոք արժեքների դեպքում (6,5—8,5) վերականգնված կոֆերմենտի և սուբստրատի (2-օքսոգլուտարատի) հազեցած կոնցենտրացիաների ներկայությամբ, կարբոդիմիդը բերում է միջմոլեկուլյար կապերի առաջացման, որոնք ֆիքսում են ֆերմենտի այն կոնֆորմացիան, որը նա ստանում է կոֆերմենտի և սուբստրատի հետ Միքաէլիսի կոմպլեքսի դոյացման ժամանակ:

ЛИТЕРАТУРА — ЦИТИРОВАННО

- ¹ K. L. Carraway, D. E. Koshland Jr., in: *Methods Enzymol.*, v. 25, pt. B Eds C. H. W. Hirs, S. N. Timashell, N. Y. Acad. Press, 1972, p. 616—623 (1972).
- ² C. Lau, F. M. Richards, *Biochemistry*, 1976, v. 15, p. 3856—3863. ³ R. Pongede, M. Satre, P. V. Vignals, *Biochemistry*, v. 18, p. 1408—1413 (1979). ⁴ R. P. Casey, M. Thelen, A. Azzl, *J. Biol. Chem.*, v. 255, p. 3894—3900 (1980). ⁵ И. И. Горшкова, О. И. Лаврик, В. В. Филиппов, *Молекулярная биология*, т. 15, с. 62—70 (1981).
- ⁶ М. К. Нурбиков, Е. С. Судаксва, О. О. Фаворова, *Биоорганическая химия*, т. 8, с. 200—207 (1982). ⁷ Г. А. Невинский, М. Г. Гаспарянц, *Биоорганическая химия*, т. 13, с. 494—505 (1977). ⁸ F. Kurzer, K. Douglath-Zedch, *Chem. Rev.*, v. 67, p. 107—152 (1967).
- ⁹ K. L. Carraway, R. B. Triplett *Biochim. et Biophys. acta*, v. 200, p. 504—511 (1970). ¹⁰ K. L. Carraway, D. E. Koshland Jr., *Biochim. et Biophys. acta*, v. 160, p. 272—274 (1978). ¹¹ С. А. Агаджанян, А. А. Арутюнян, Л. В. Карабашян, *Биоорганическая химия*, т. 10, с. 1171—1176 (1984). ¹² С. А. Агаджанян, Л. В. Карабашян, *Биохимия*, т. 47, с. 1022—1026 (1982). ¹³ H. M. Levy, P. D. Leber, E. M. Ryan, *J. Biol. Chem.*, v. 238, p. 3654—3659 (1963). ¹⁴ E. J. Rife, W. W. Cleland, *Biochemistry*, v. 19, p. 2328—2333 (1980).