

УДК 577.152.141'3'13

С. А. Агаджанян, А. Г. Аракелян, К. В. Даноян, Р. А. Казарян, Л. В. Карабашян

Иммобилизация глутаматдегидрогеназы митохондрий печени крысы на сефарозе. Изучение инактивации и диссоциации гексамера под влиянием мочевины.

(Представлено академиком НАН Армении К.Г.Карагезяном 15/У1995)

Каталитически активная молекула глутаматдегидрогеназы печени крысы, аналогично глутаматдегидрогеназе печени быка, представляет собой гексамер, сформированный из идентичных по аминокислотной последовательности субъединиц (1,2). Одним из наиболее информативных подходов, используемых для выяснения структурно-функциональных особенностей олигомерных ферментов, является подход, основанный на применении иммобилизованных форм этих ферментов.

Настоящая работа посвящена исследованию инактивации и диссоциации под влиянием мочевины иммобилизованного на сефарозе CL-4В производного глутаматдегидрогеназы печени крысы, имитирующего по каталитическим и регуляторным характеристикам растворимый фермент, с целью выяснения особенностей структурной организации этого фермента.

Глутаматдегидрогеназу выделяли из интактных митохондрий печени крысы, полученных методом Бронснана и соавторов (3). Интактные митохондрии в виде осадка, полученного из 20 г печеночной ткани, суспендировали в 20 мл буфера, содержащего 2 мМ Hepes, 220 мМ маннита, 70 мМ сахарозы и 10^{-4} М ЭДТА рН 7,2. Суспензию подвергали sonicации при частоте 22 кГц в течение 15 с в ледяной бане. Затем к суспензии добавляли два объема 2 мМ Hepes рН 7,2 и центрифугировали при 20000 g. Надосадочную фракцию, обладающую глутаматдегидрогеназной активностью, отделяли и подвергали очистке от балластных белков, с помощью последовательного фракционирования 30- и 45%-ным сульфатом аммония. Обладающий ферментативной активностью осадок растворяли в 3 мл 0,05 М калий-фосфатного буфера рН 7,2 и освобождали от остатка сульфата аммония на колонке сефадекса G-25 (2,5×30 см), уравновешенной тем же буфером. Дальнейшую очистку глутаматдегидрогеназы проводили, используя ионообменную хроматографию на ДЕАЕ сефадексе А-50. Полученный на предыдущей стадии препарат

фермента наносили на колонку (2,5×15 см) ДЕАЕ сефадекса А-50, уравновешенную 0,05 М КСI в 0,05 М калий-фосфатном буфере рН 7,2 и промывали 60 мл того же буфера. Элюцию глутаматдегидрогеназы проводили в линейном градиенте 0,05-0,4 М КСI (по 150 мл каждого раствора) в том же буфере. Скорость элюции 18 мл/ч. Фракции, обладающие глутаматдегидрогеназной активностью, объединяли. На данной стадии было получено 42 мг белка с концентрацией 5,6 мг/мл и удельной глутаматдегидрогеназной активностью 21 ед/мг белка.

Фракции, обладающие глутаматдегидрогеназной активностью, объединяли, диализовали против 100-кратного объема 0,05 М калий-фосфатного буфера и подвергали повторной хроматографии на колонке (2,5×15 см) ДЕАЕ сефадекса А-50, уравновешенной 0,1 М КСI в том же буфере. Элюцию глутаматдегидрогеназы проводили 200 мл линейного градиента 0,15-0,35 М КСI в 0,05 М калий-фосфатном буфере рН 7,2. Скорость элюции 12 мл/ч. В результате проведенных процедур было получено 12 мг электрофоретически гомогенного белка с удельной глутаматдегидрогеназной активностью 32 ед/мг на 1 мг белка. Гомогенность препарата определяли методом электрофореза в ПААГ, как это описано в работе (4). За единицу активности принято количество белка, катализирующее превращение 1 мкмоль NADH в 1 мин в реакции восстановительного аминирования 2-оксоглутарата. Активацию сефарозы ВгСN и иммобилизацию на ней глутаматдегидрогеназы проводили по методу, описанному ранее (5). Концентрацию глутаматдегидрогеназы в растворе определяли спектрофотометрически, принимая коэффициент поглощения при 280 нм равным $0,97 \text{ (см} \cdot \text{мг/мин)}^{-1}$ (6). Содержание белка в иммобилизованных образцах определяли модифицированным методом Лоури (7). Активность растворимых и иммобилизованных препаратов глутаматдегидрогеназы определяли по скорости изменения экстинкции NADH при 340 нм в процессе реакции восстановительного аминирования 2-оксоглутарата, как это описано ранее (5). Число субъединиц гексамера глутаматдегидрогеназы, вовлекаемых в ковалентную связь с носителем, определяли исходя из содержания белка на сефарозе после ее обработки 8 М мочевиной, аналогично методу, описанному ранее (5).

В табл.1 приведены некоторые показатели свойств глутаматдегидрогеназы печени крысы, иммобилизованной на сефарозе, в зависимости от количества ВгСN, используемого для активации геля.

Из приведенных данных видно, что при иммобилизации глутаматдегидрогеназы на сефарозе, активированной относительно малым количеством ВгСN (5 мг на 1 мл геля), гексамер фермента ковалентно сшивается на сефарозе с помощью одной из субъединиц. При этом иммобилизация практически не отражается на каталитических свойствах фермента. Вместе с тем повышение количества ВгСN, используемого при активации 1 мл геля, приводит к ковалентной сшивке гексамера посредством более чем одной единицы и сопровождается понижением V_{max} реакции. Одновременно с этим наблюдается понижение K_m 2-оксоглутарата. В то же время K_m NADH практически не зависит от числа субъединиц, ковалентно связанных с носителем.

Таблица 1

Свойства иммобилизованной на сефарозе CL-4В глутаматдегидрогеназы митохондрий печени крысы в зависимости от количества ВгСN, используемого для активации 1 мл геля сефарозы

Кол-во ВгСN, мг/мл геля	Кол-во иммобилизованного белка, мкг/мл геля	Кол-во субъединиц гексамера, ковалентно связанных с носителем	Активность иммобилизованного фермента, % от активности растворимого фермента	V_{max} , мкмоль/мин.мг	$K_m \cdot 10^{-4}$	
					2-оксоглутарат	NADH
2,5	6	1	100			
5	14	1	100	20(20)	1,8(1,7)	2,5(2,2)
20	140	1,6	60			
50	230	1,9	35	7	0,7	2,5

Примечание. В скобках приведены данные для растворимого фермента.

Сравнение каталитических активностей растворимой и иммобилизованных глутаматдегидрогеназ при различных рН показало, что образец фермента, ковалентно связанный с носителем с помощью одной из субъединиц, по рН-зависимости не отличается от растворимой глутаматдегидрогеназы и проявляет максимальную активность в реакции восстановительного аминирования 2-оксоглутарата при рН 7,8. Вместе с тем при иммобилизации фермента на носителе посредством ковалентной сшивки более одной субъединицы наблюдается уширение области рН, в которой фермент проявляет максимальную каталитическую активность.

Согласно результатам изучения зависимостей активности иммобилизованных и растворимой глутаматдегидрогеназ от концентрации аллостерических эффекторов GTP и ADP, образец фермента, иммобилизованного на сефарозе посредством ковалентной сшивки одной из субъединиц, не отличается от растворимого фермента регуляцией со стороны этих эффекторов, в то время как при ковалентной фиксации фермента с помощью более чем одной субъединицы наблюдается понижение эффективности действия аллостерических регуляторов. Это, скорее всего, обусловлено многоточечной фиксацией фермента на носителе, приводящей к ограничению конформационных возможностей гексамера в целом. В частности, концентрация GTP, при которой происходит полунгибирование фермента, иммобилизованного посредством в среднем 1,9 субъединиц, достигает $3,5 \cdot 10^{-5}$ М по сравнению с $8 \cdot 10^{-6}$ М для растворимого фермента. При этом предельный уровень активности иммобилизованного фермента при насыщающих концентрациях GTP достигает 16% против 4% для растворимой глутаматдегидрогеназы. Предельный уровень активации ADP того же образца иммобилизованного фермента понижается до 115% против 210% для растворимого фермента.

Проведенные исследования позволяют заключить, что гексамер глутаматдегидрогеназы печени крысы, иммобилизованный на сефарозе CL-4B, активированной BrGN (5 мг на 1 мл набухшего геля), по каталитическим и регуляторным свойствам имитирует нативную глутаматдегидрогеназу и может служить удобной моделью для изучения структурно-функциональных особенностей этого фермента. В дальнейшем, используя этот образец иммобилизованной глутаматдегидрогеназы, было проведено исследование процессов инактивации фермента под действием мочевины при различных рН.

Согласно данным табл.2, иммобилизация, независимо от рН, приводит к повышению резистентности фермента к инактивирующему действию мочевины.

Анализ кинетических зависимостей инактивации иммобилизованной глутаматдегидрогеназы под действием мочевины при различных рН инкубационной среды, в частности под влиянием 4 М мочевины при рН 7,4 и 3 М мочевины при рН 5,6 и 8,9 соответственно, показали, что происходит практически полная инактивация фермента. При этом процессы инактивации, независимо от рН, подчиняются кинетике первого порядка. Константы скоростей первого порядка соответствующих процессов приведены в табл.3.

Таблица 2

Концентрации мочевины (М), при которых происходит полунинактивация растворимой и иммобилизованной глутаматдегидрогеназы при различных значениях рН инкубационной среды (время инкубации 30 мин, 25°C)

Образец фермента	рН		
	5,6	7,4	8,9
Растворимый	1,2	2,4	1,0
Иммобилизованный	2,2	3,6	2,0

Таблица 3

Константы скоростей (K_s , мин⁻¹) процессов инактивации иммобилизованной глутаматдегидрогеназы под влиянием мочевины при различных рН и в присутствии различных лигандов

рН	5,6		7,4		8,9	
Концентрация мочевины, М	3	2,5	4	3,5	3	2,5
При отсутствии лигандов	0,184	0,051	0,077	0,019	0,258	0,088
В присутствии:						
10 ⁻² М 2-оксоглутарата	0,184		0,077		0,258	
10 ⁻⁴ М NADH	0,263		0,411		0,433	
10 ⁻³ М 2-оксоглутарата	0,124	0,053	0,177		0,341	
+ 10 ⁻⁴ М NADH	0,051	0,007				

Полученные результаты свидетельствуют о том, что при всех исследованных значениях рН инкубационной среды индуцируемые мочевиной процессы инактивации глутаматдегидрогеназы печени крысы являются одностадийными и не проходят через стадию образования конформационно устойчивых, каталитически активных олигомерных фрагментов гексамера, как это наблюдалось при инактивации иммобилизованной глутаматдегидрогеназы печени быка при рН 5,6 (8). Оценка количества белка, остающегося связанным с сефарозой после завершения процесса диссоциации, показала, что во всех исследованных случаях с носителя смывается более 80% белка. Эти данные свидетельствуют, что в результате обработки мочевиной иммобилизованный гексамер диссоциирует до субъединицы. Ранее (5,8,9), при аналогичных исследованиях иммобилизованной глутаматдегидрогеназы печени быка, было показано, что коферменты и субстраты влияют на характер диссоциации и инактивации иммобилизованного фермента. В частности, в присутствии NADH и 2-оксоглутарата под действием мочевины иммобилизованный гексамер диссоциирует до конформационно устойчивого каталитически активного иммобилизованного тримера.

Результаты исследований кинетических зависимостей иммобилизованной глутаматдегидрогеназы печени крысы под влиянием 4 М мочевины при pH 7,4 и 3 М мочевины при pH 5,6 и 8,9 в присутствии 10^{-2} М 2-оксоглутарата и 2×10^{-4} М NADH показали, что 2-оксоглутарат в концентрациях до 10^{-2} М практически не влияет на процесс инактивации иммобилизованной глутаматдегидрогеназы печени крысы. Напротив, NADH приводит к понижению устойчивости иммобилизованного фермента к инактивирующему действию мочевины, однако не влияет на характер процесса инактивации. Вместе с тем при одновременном присутствии в инкубационной среде NADH и 2-оксоглутарата при pH 5,6 кинетика инактивации иммобилизованного фермента имеет двустадийный характер. Скорее всего, первая, быстрая, стадия инактивации обусловлена диссоциацией гексамера до относительно устойчивого каталитически активного олигомерного фрагмента, который в дальнейшем, на второй стадии, инактивируется под влиянием присутствующей в инкубационной среде мочевины.

Зависимости инактивации иммобилизованного фермента, индуцируемой 2,5 М мочевины при pH 5,6 в присутствии NADH и 2-оксоглутарата, показали, что на первой стадии, которая практически завершается через 10-15 мин инкубации, ферментативная активность понижается примерно на 50%. Эта стадия характеризуется константой скорости реакции первого порядка $K_s = 0,053$. Вторая же, медленная, стадия протекает с крайне низкой скоростью ($K_s = 0,007$), и в последующие 30 мин фермент дополнительно теряет лишь 5-7% активности. Эти данные позволяют предположить, что при относительно низкой концентрации (2,5М) процесс инактивации фермента обусловлен в основном диссоциацией иммобилизованного гексамера до относительно устойчивого, при данной концентрации мочевины, иммобилизованного фрагмента.

Оценка количества белка, связанного с сефарозой, показала, что в результате инкубации иммобилизованного гексамера в данных условиях в течение 15, 30 и 45 мин на носителе остается 40-50% начального содержания белка. Принимая во внимание эти результаты и сопоставляя их с результатами аналогичных исследований иммобилизованных производных глутаматдегидрогеназы печени быка (5,8,9), следует заключить, что первая стадия инактивации иммобилизованного гексамера глутаматдегидрогеназы печени крысы обусловлена его диссоциацией до каталитически активного иммобилизованного тримера. На второй же, медленной, стадии, наблюдаемой в присутствии 3 М мочевины, происходит инактивация этого тримера, которая может быть следствием его изомеризации до неактивного конформера или диссоциации до конформационно неустойчивых субъединиц. Не исключена также возможность последовательной реализации обоих процессов, как это имеет место в случае глутаматдегидрогеназы печени быка (8,9).

Институт молекулярной биологии НАН Армении

Առնետի լյարդի միտոքոնդրիաններից անջատված գլուտամատոդեհիդրոգենազի ինոբիլիզացումը սեֆառոզի վրա: Հեքսամերի ինակտիվացման և դիսոցման ուսումնասիրությունը միզանյութի առկայությամբ

Կատարվել է առնետի լյարդի միտոքոնդրիոմներից անջատված գլուտամատոդեհիդրոգենազի (*L*-գլուտամատ-*NAD* (*P*) -օքսիդառեդուկտազ, Ֆ.Դ.1.4.1.3.) կոփայենտ միացում *BrCN*-ով տարբեր աստիճանի ակտիվացված *CL-4B* սեֆառոզի վրա: Ցույց է տրված, որ գլուտամատոդեհիդրոգենազը, որը կապված է 5 մգ *BrCN*-ը 1 մլ ուռչած գելին, ակտիվացված սեֆառոզի հետ իր կատալիտիկ և կարգավորիչ հատկանիշներով նմանվում է բնական ֆերմենտին և կարող է ծառայել որպես մոդել գլուտամատոդեհիդրոգենազի կառուցվածքա-ֆունկցիոնալ հատկանիշների ուսումնասիրման համար:

Ուսումնասիրված է կապված գլուտամատոդեհիդրոգենազի ինակտիվացման պրոցեսը միզանյութի ազդեցությամբ միջավայրի տարբեր *pH*-ների (5,6, 7,7, 8,9) դեպքում և կոֆերմենտի (*NADH*) ու սուբստրատի (2-օքսոգլուտարատ) առկայությամբ: Ցույց է տրված, որ միզանյութի ազդեցությամբ պայմանավորված գլուտամատոդեհիդրոգենազի ինակտիվացման պրոցեսը *NADH*-ի և 2-օքսոգլուտարատի միաժամանակյա առկայությամբ միջավայրի *pH* 5,6-ի դեպքում, իրենից ներկայացնում է երկաստիճան պրոցես, և ընթանում է հեքսամերի հարաբերականորեն կայուն կատալիտիկ ակտիվ ֆրագմենտի առաջացումով, որն, ամենայն հավանականությամբ, իրենից ներկայացնում է տրիմեր:

ЛИТЕРАТУРА-ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

¹ K.S.King, G.Frieden, J.Biol.Chem., v.245, №17, p.4391-4396 (1970). ² E.L.Smith, B.M.Austen, K.M.Blumenthal e.a., The enzymes, ed: Boyer P.D.N.Y., Academic Press v.11, p.293-267 (1975). ³ John T.Bronspan, Bozena Korec, Irving B.Pritt, The Journal of Biol. Chemistry., v.248, №11, p.4075-4082 (1973). ⁴ Л.В.Карабашян, Н.Г.Экизян, В.М.Сафарян и др., Молекулярная биология, т.14, №4, с.773-778 (1980). ⁵ Л.В.Карабашян, С.А.Агаджанян, К.В.Даноян и др., Биологическая химия, т.14, №11, с.1495-1501 (1988). ⁶ J.A.Olson, C.B.Apfinsen, Biol.Chem., v.197, №1, p.67-69, 211-220 (1952). ⁷ T.O.Golovina, T.V.Cherednikova, A.T.Mevkh, Anal. Biochem., v.83, №2, p.778 (1977). ⁸ Л.В.Карабашян, С.А.Агаджанян, К.В.Даноян и др., Биологическая химия, т.14, №11, с.1502-1508 (1988). ⁹ Л.В.Карабашян, С.А.Агаджанян, К.В.Даноян и др., Биоорганическая химия, т.15, №1, с.32-39 (1989).