

УДК 616.153.1:577.158.347

ПРИМЕНЕНИЕ ПИРИДОКСАЛЯ И ПИРИДОКСАЛЬФОСФАТА ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ АКТИВНОГО ЦЕНТРА ГЛУТАМАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ

Լ. В. КАРАБАՅԻԱՆ, Ն. Գ. ԷՔԻՅԻԱՆ, Տ. Գ. ՄՈՎՏԵՏԻԱՆ

Изучены спектральные свойства глутаматдегидрогеназы, модифицированной пиридоксалем и пиридоксальфосфатом по ϵ -аминогруппе остатка Лиз-126, расположенного в зоне активного центра фермента. Показано, что в обоих случаях пиридиновое ядро расположено на поверхности фермента. Ионогенные группы пиридинового хромофора воздействуют, по крайней мере, с двумя противоположно заряженными участками в области активного центра глутаматдегидрогеназы. Предполагается, что эти заряженные участки могут быть ответственны за связывание субстратов.

В последнее время пиридоксальфосфат и его производные находят широкое применение при химической модификации белков. В литературе описан ряд ферментов, в которых с помощью пиридоксаль-Р осуществлена избирательная модификация ϵ -аминогрупп остатков лизинов, расположенных в зоне активного центра [1—5]. Значительное внимание в этом плане уделено избирательной модификации ϵ -аминогруппы остатка Лиз-126, расположенного в активном центре глутаматдегидрогеназы (ГДГ) [6—8]. Цель этих работ состояла в определении функциональной роли модифицируемой группы, его местоположения в полипептидной цепи, а также выяснении вопросов, связанных с механизмом влияния ковалентно связанного пиридоксального остатка на каталитические свойства ГДГ.

Однако спектральные свойства пиридоксаль-Р и его производных, которые определяются ионным состоянием пиридинового ядра и чрезвычайно чувствительны к окружающей среде, детально изучены в модельных системах [9]. Вместе с тем накоплен большой экспериментальный материал по спектрам поглощения и кругового дихроизма ферментов, содержащих пиридоксаль-Р в качестве кофермента [10, 11]. В связи с этим пиридоксаль-Р и его аналоги стали применяться в качестве «репортерных групп» для изучения активных центров ферментов, а также изучения процессов, происходящих в области расположения остатка пиридоксаль-Р при связывании различных лигандов [12].

В настоящей работе исследованы спектральные свойства глутаматдегидрогеназы, модифицированной по ϵ -аминогруппе остатка Лиз-126 пиридоксальфосфатом (ГДГ/Р-Рху) и пиридоксалем (ГДГ/Рху) с

целью изучения положения пиридинового ядра относительно глобулы фермента и его взаимодействия с заряженными группами в области активного центра.

Материал и методика. В работе использовали кристаллический препарат ГДГ из печени быка («Fluka», Швейцария), суспензированный в насыщенном растворе сульфата аммония. Перед применением препарат центрифугировали и очищали от низкомолекулярных примесей на колонке 1×20 см с сефадексом G-25. В качестве элюирующего раствора использовали 0,1 М калий-фосфатный буфер, pH 7,1.

ГДГ (P-Pxy) и ГДГ (Pxy) получали по методу, аналогичному описанному в работе Брауна и др. [13]. Концентрацию ГДГ, ГДГ (P-Pxy) и ГДГ (Pxy) определяли спектрофотометрически, используя следующие коэффициенты экстинкции: $\epsilon_{279} = 0,97$ см² мг/мл, $\epsilon_{279} = 1,25$ см² мг/мл и $\epsilon_{279} = 1,20$ см² мг/мл соответственно [13].

Пиридоксальфосфат, пиридоксаль, пиридоксамин-P, пиридоксамин («Sigma», США) использовали без дополнительной очистки. Концентрации определяли спектрофотометрически, используя следующие коэффициенты молярной экстинкции: $\epsilon_{388} = 4900$ М⁻¹ см⁻¹ для пиридоксаль-P и пиридоксала, $\epsilon_{325} = 7300$ М⁻¹ см⁻¹ для пиридоксамин-P и пиридоксамина [14].

Спектры поглощения снимали на спектрофотометре Cary-15, спектры кругового дихроизма (КД)—на дихрографе Roussel-Jouan. Оптические плотности исследуемых веществ не превышали 1,8 о. е. Степень денатурации белков под действием мочевины определяли по уменьшению амплитуды КД в полосе поглощения α -спиральных участков полипептидной цепи (223 нм). В качестве показателя денатурации использовали параметр $[\theta]_m / [\theta]_0$, где $[\theta]_m$ и $[\theta]_0$ —эллиптичности при 223 нм в растворе мочевины и в буфере соответственно.

Спектры температурной пертурбации снимали на прецизионной шкале 0—0,1 о. е. спектрофотометра Cary-15. Температуру в кювете сравнения поддерживали на уровне $25 \pm 0,1^\circ$, в кювете измерения она варьировала в пределах 25 — 12° с точностью $0,1^\circ$.

Оценку степени доступности хромофора молекулам растворителя проводили аналогично методу, предложенному Дудкиной и др. [12], по температурной зависимости изменения максимума разностного спектра температурной пертурбации ($\epsilon_{T^0} / \epsilon_{25^\circ}$).

Спектры поглощения как функцию от pH измеряли на спектрофотометре Cary-15. Для достижения нужного значения pH раствор белка в 0,1 М KCl титровали в кювете 0,1 М HCl или 0,1 М KOH. pH растворов измеряли используя pH-метр «pH-340», снабженный микроэлектродами. Точность измерения pH составляла $\pm 0,05$ ед.

Результаты и обсуждение. Пиридоксаль-P и пиридоксаль образуют с ϵ -аминогруппами остатка Лиз-126 азометиновую связь, восстановление которой с помощью NaBH₄ приводит к ковалентной фиксации пиридоксалевого производного на ферменте [15, 16]. Образующееся производное пиридоксамин-P или пиридоксамина обладает полосой поглощения при 328 нм вне области поглощения хромофоров белка (рис. 1). Видно, что модификация не сказывается заметным образом на форме спектра в области поглощения ароматических групп фермента. Приведенные на рис. 2 изотермы денатурации ГДГ и его модифицированных аналогов под влиянием мочевины свидетельствуют о том, что модификация практически не сказывается также на конформационной стабильности ГДГ. Следует отметить, что активность модифицированных ферментов падает примерно на 90%. В ряде работ этот факт связывается с решающей ролью остатка Лиз-126 в связывании субстратов [8, 15, 16]. Вместе с тем методом разностной спектрофотометрии было показано [13], что модифицированный фермент со-

храняет способность связывать ряд специфических лигандов (аллостерические регуляторы и некоторые коферменты). При этом связывание лигандов не вызывает заметных изменений в области поглощения пиридинового ядра. Эти данные вместе с полученными нами экспериментальными результатами (рис. 1 и рис. 2) свидетельствуют о том, что

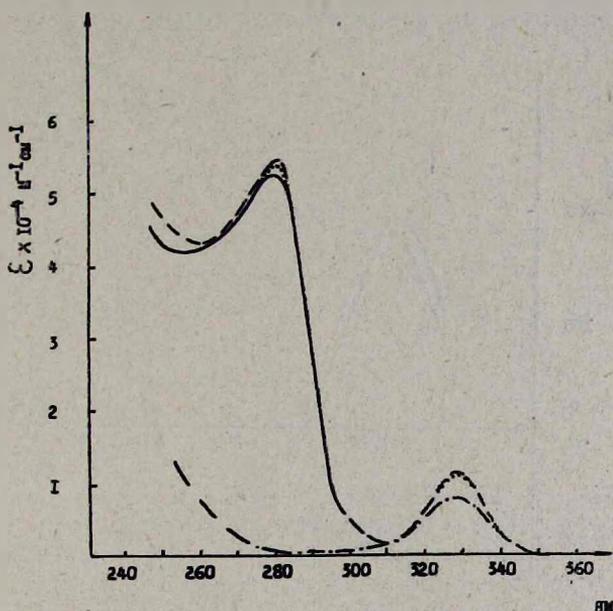


Рис. 1. Спектры поглощения: ГДГ—(—), ГДГ (P-Rхy)—(---), ГДГ (Rхy)—(....), пиридоксамин-Р и пиридоксамина—(-·-·-) (0,1 М К-фосфатный буфер, рН 7,1; T=25°).

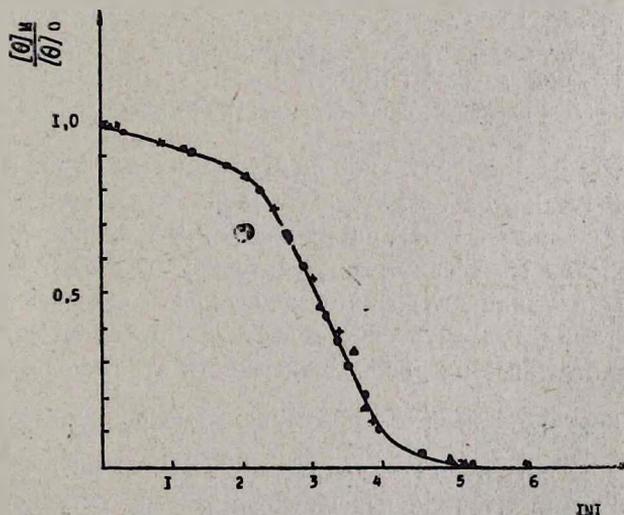


Рис. 2. Относительное изменение эллиптичности при 223 нм под действием мочевины: ГДГ—(●), ГДГ (P-Rхy)—(▲), ГДГ (Rхy)—(X). (Остальные данные по рис. 1).

пиридиновое ядро слабо взаимодействует с белковой матрицей и не вызывает существенных изменений во вторичной и третичной структурах ГДГ. Об этом говорит также то, что, согласно нашим данным, белковая матрица не индуцирует КД в области поглощения пиридинового ядра, как это наблюдается при модификации рибонуклеазы А [17].

Для подтверждения этого положения нами были изучены спектры температурной пертурбации модифицированных ГДГ. На рис. 3 пред-

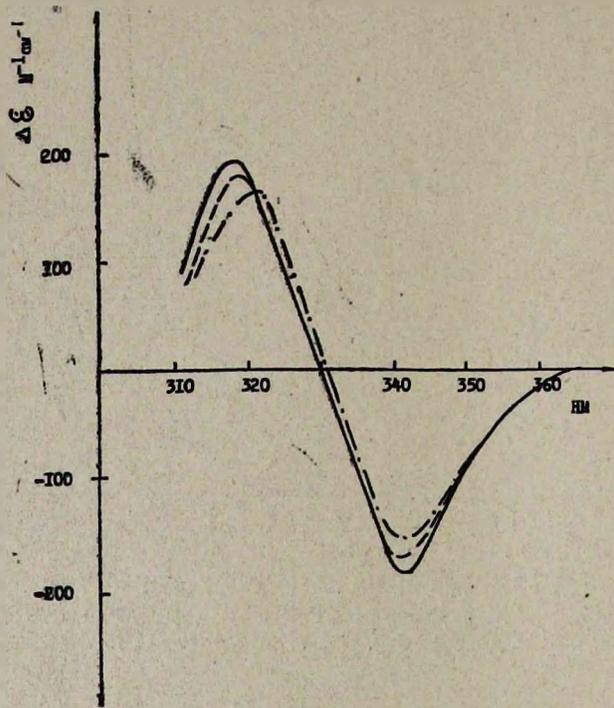


Рис. 3. Разностные спектры температурной пертурбации (при 15°) пиридинового хромофора в ГДГ (Р-Рху) — (---), ГДГ (Рху) — (-·-·-), пиридоксамин-Р и пиридоксамин — (—). (Остальные данные по рис. 1).

ставлены спектры температурной пертурбации пиридинового хромофора в ГДГ (Р-Рху) и ГДГ (Рху) в сравнении с аналогичными данными для модельных хромофоров: пиридоксамин-Р и пиридоксамин. В обоих случаях разностные спектры характеризуются коротковолновой положительной и длинноволновой отрицательной полосами с близкими значениями амплитуд, что свидетельствует о характерном «красном сдвиге». Приведенные на рис. 4 зависимости относительного изменения амплитуды пертурбации $\left(\frac{\epsilon_{T^\circ}}{\epsilon_{25^\circ}}\right)$ в максимуме разностного спектра показывают, что доступность пиридинового хромофора в ГДГ (Рху) молекулам растворителя практически совпадает с доступностью модельного хромофора—пиридоксамин. Доступность же пиридинового ядра в ГДГ (Р-Рху) незначительно ниже доступности пиридоксамин-Р (на

10—15%). Иными словами, пиридиновые ядра в модифицированных ферментах находятся на поверхности глобулы, однако фосфопиридоксильный остаток в ГДГ (Р-Рху) незначительно контактирует с поверхностью фермента.

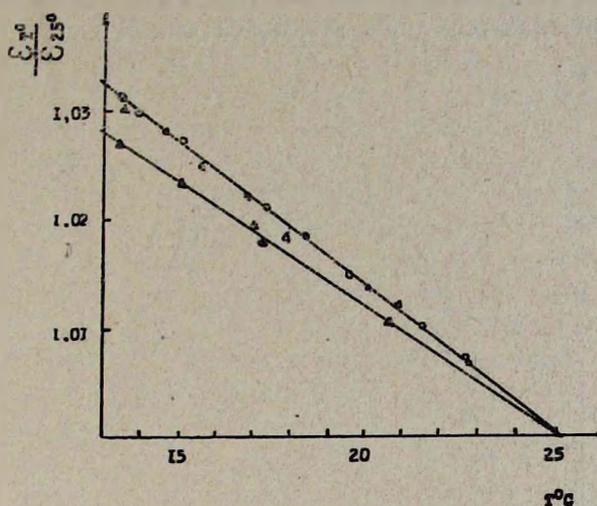


Рис. 4. Зависимость относительного изменения максимума экстинкции пертурбированных спектров поглощения от температуры: (●)—пиридоксамин-Р ($\lambda=319$ нм), (○)—пиридоксамин ($\lambda=319$ нм), (X)—ГДГ (Рху) ($\lambda=320$ нм), (▲)—ГДГ (Р-Рху) ($\lambda=322$ нм). (Остальные данные по рис. 1).

Дальнейшая информация о взаимодействии пиридинового ядра с поверхностью фермента в области активного центра была получена при изучении рН-зависимости спектров поглощения модифицированных ферментов. Известно, что в водном растворе пиридоксамин существует в виде четырех спектроскопически различающихся форм (схема), равновесие между которыми определяется величиной рН среды.

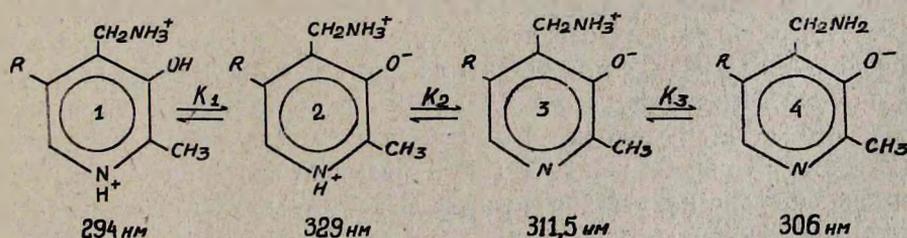


Схема.

где R—заместитель в положении «5», ионное состояние которого не влияет на спектры поглощения [18].

Анализ нормированных рН-зависимостей модифицированных производных ГДГ с аналогичными зависимостями для соответствующих модельных хромофоров (рис. 5) показывает, что в обоих случаях ионо-

генные группы пиридинового ядра испытывают влияние заряженных участков фермента. В ГДГ (Р-Рху) азот пиридинового ядра и 3-оксигруппа взаимодействуют соответственно с положительно и отрицательно заряженными группами белковой матрицы (значение pK_1 сдвигается от 3,7 до 3,1, а значение pK_2 —от 8,6 до 9,4). В то же время в ГДГ (Рху) обнаруживается лишь взаимодействие 3-оксигруппы пиридино-

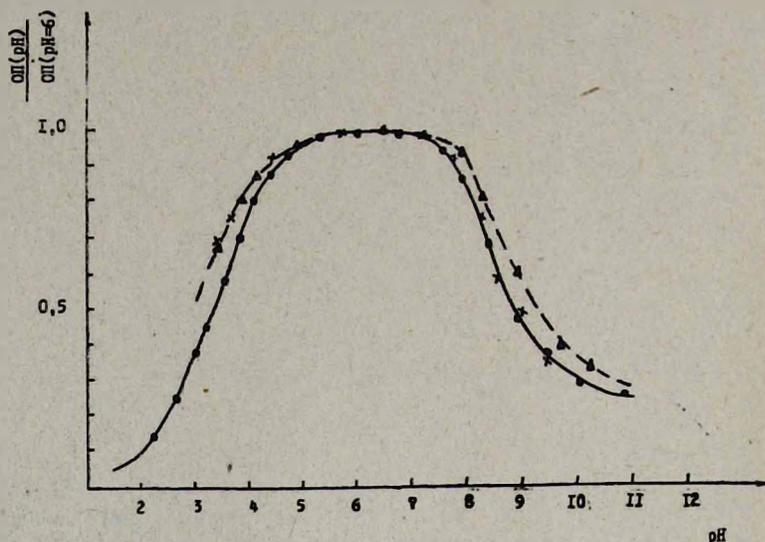


Рис. 5. Спектрофотометрическое титрование: ГДГ (Р-Рху)—(▲), ГДГ (Рху)—(X), пиридоксамин-Р и пиридоксамин—(●) при 328 нм, $T=25^\circ$.

вого ядра с положительно заряженным локусом фермента (значение pK_1 сдвигается от 3,7 до 3,1, а значение pK_2 —практически не изменяется).

Полученные результаты хорошо коррелируют с данными температурной пертурбации и свидетельствуют о принципиально различной ориентации пиридинового ядра в ГДГ (Р-Рху) по сравнению с ГДГ (Рху), что, видимо, обусловлено отсутствием дианиона фосфата в последнем. Этот вывод согласуется с данными работы Брауна и др. [13], в которой отмечается, что в ГДГ (Р-Рху) ориентация фосфопиридоксильного остатка такова, что препятствует связыванию кофермента (НАДН), в то время как ГДГ (Рху) связывает кофермент с константой ассоциации, незначительно отличающейся от аналогичной величины для ГДГ. По-видимому, в зоне активного центра ГДГ имеется положительно заряженный локус, с которым взаимодействует фосфатная группа Р-Рху.

Изучение рН-зависимости спектров поглощения модифицированных ферментов в присутствии аллостерических регуляторов (АДР и ГТР) и коферментов (НАД и НАДН) показало, что pK_1 и pK_2 ионогенных групп пиридинового хромофора не изменяются в их присутствии. Следовательно, заряженные участки, с которыми взаимодействуют ионо-

генные группы пиридинового ядра и фосфатная группа Р-Рху не принимают участия в связывании аллостерических регуляторов и кофермента.

Таким образом, проведенные эксперименты показали, что при селективной модификации пиридоксалем и пиридоксаль-Р остатка Лиз-126, расположенного в области активного центра ГДГ, пиридиновое ядро располагается на поверхности глобулы фермента. Фосфопиридоксильный остаток в ГДГ (Р-Рху) незначительно погружен в белковую глобулу, в то время как пиридоксильный остаток в ГДГ (Рху) практически полностью доступен растворителю. Изучение рН-зависимости модифицированных ферментов показало, что ионогенные группы пиридинового ядра в обоих модифицированных ферментах взаимодействуют с зараженными участками ГДГ, которые могут быть ответственны за связывание субстратов (α -кетоглутарата, глутамата и иона NH_4^+).

Совместный анализ данных по доступности и рН-зависимости пиридинового хромофора позволяет прийти к заключению, что заряженные области расположены на поверхности фермента.

Институт биохимии АН АрмССР

Поступило 20.IV 1977 г.

**ՊԻՐԻԴՈՔՍԱԼԻ ԵՎ ՊԻՐԻԴՈՔՍԱԼՖՈՍՖԱՏԻ ԿԻՐԱՌՈՒՄԸ
ԴԼՈՒՏԱՄԱՏԻԵԶԻԴՐՈԳԵՆԱԶԱՅԻ ԱԿՏԻՎ ԿԵՆՏՐՈՆԻ
ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՄԱՆ ՀԱՄԱՐ**

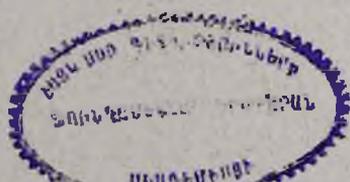
Լ. Վ. ԿԱՐԱԲԱՇԻԱՆ, Ն. Գ. ԷԲԻԶԻԱՆ, Ս. Գ. ՄՈՎՍԵՍԻԱՆ

Ուսումնասիրվել է գլուտամատրեհիդրոգենազայի (ԳԴՀ) սպեկտրային հատկությունները, որը ձևափոխվել է պիրիդոքսալով և պիրիդոքսալֆոսֆատով ֆերմենտի ակտիվ կենտրոնի շրջանում տեղադրված Լիզ-126-ի ամինախմբի հաշվին: Ցույց է տրվել, որ ԳԴՀ-ի այդ երկու ձևափոխությունների դեպքում էլ պիրիդինային կորիզը տեղադրված է ֆերմենտի մակերեսի վրա: Պիրիդինային խրոմոֆորի փոնոգեն խմբերը փոխազդում են, համենափոքիս, երկու հակառակ լիցքավորում ունեցող տեղամասերի հետ, որոնք գտնվում են ԳԴՀ-ի ակտիվ կենտրոնի շրջանում: Ենթադրվում է, որ նշված լիցքավորված տեղամասերը կարող են պատասխանատու լինել սուբստրատների կապի համար:

**THE USE OF PYRIDOXYL AND PHOSPHOPYRIDOXYL
FOR STUDYING OF THE ACTIVE CENTRE
OF GLUTAMATE-DEHYDROGENASE**

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

The spectral properties of phosphopyridoxyl and pyridoxyl — Glutamate Dehydrogenase modified at the E— NH_2 group of the Lys-126 which was located in a close proximity of the active site have been studied. It has been established that the pyridine ring of the modified



enzymes was located on the surface of the protein globule. The pH dependence on the absorption spectra of the modified enzymes shows that the ionogenic groups of the pyridine chromophore interact with the positively and negatively charged groups of the protein.

Obtained data show that these charged locuses may be important for binding of the substrates.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Vallu B. L., Riordan I. F. *Ann. Rev. Biochem.*, 38, 733, 1969.
2. Ripa M., Spanio L., Pontremoli S. *Arch. Biochem. and Biophys.*, 118, 48, 1967.
3. Shapiro S., Enser M., Pugh E., Horecker B. L. *Arch. Biochem. and Biophys.* 128, 554, 1968.
4. Marcus F., Hubert F. *J. Biol. Chem.*, 243, 4929, 1968.
5. Schackerz K. D., Noltmann E. A. *Biochemistry*, 10, 4837, 1971.
6. Anderson B. M., Anderson C. D. and Churchich J. E. *Biochemistry*, 5, 2893, 1966.
7. Piszkiwicz D., Landon M. and Smith E. L. *J. Biol. Chem.*, 245, 2622, 1970.
8. Goldin B. R. and Frienen C. *J. Biol. Chem.*, 247, 2139, 1972.
9. Морозов Ю. В., Бажулина Н. П., Карпейский М. Я., Иванов В. И., Куклин Н. И. *Биофизика*, 11, 229, 1966.
10. Jonson R. I., Metzler D. E. In: *Methods in Enzymology*, 18, 433, Mc Cormik D. B., Wright L. D., Ed. Academic Press., 1970.
11. Hayalshi O., Shizuta Y. In *Vitamins and Hormones* 28, 245, Marris R. S. et al. Eds. Academic Press, 1970.
12. Дудкин С. М., Карабашян Л. В., Борисова С. Н., Шляпников С. В., Карпейский М. Я. *Молекулярная биология*, 9, 36, 1975.
13. Brown A., Gulver I. M., Fisher H. F. *Biochemistry*, 12, 4367, 1973.
14. Peterson E. A., Sober H. A. *J. Amer. Chem. Soc.*, 76, 169, 1954.
15. Piszkiwicz D. and Smith E. L. *Biochemistry*, 10, 4544, 1971.
16. Piszkiwicz D. and Smith E. L. *Biochemistry*, 10, 4538, 1971.
17. Dudkin S. M., Karabachyan L. V., Borisova S. N., Shlyapnikov S. V., Karpetsky M. Ia. and Geldarov T. G. *Biochimica et Biophysica Acta*, 386, 275, 1975.
18. Морозов Ю. В., Бажулина Н. П., Карпейский М. Я. *Химия и биология пиримидинового катализа*, ред. Браунштейна А. Е., Северина Е. Е., Снелла Э. Э., Торчинского Ю. М., 37, М., 1968.