

УДК 577.158

БИОХИМИЯ

В. Р. ШАТИЛОВ, В. Г. АМБАРЦУМЯН, М. А. КАСПАРОВА,  
член-корреспондент АН СССР В. Л. КРЕТОВИЧ

### ВЛИЯНИЕ ПАРА-ХЛОРМЕРКУРИБЕНЗОАТА НА ГЛЮТАМАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ХЛОРЕЛЛЫ

В предыдущих работах (<sup>1-4</sup>) нами было показано, что в клетках хлореллы *Chlorella pyrenoidosa* Pringsheim 82 T содержатся три глутаматдегидрогеназы (ГДГ): конститутивная, функционирующая как с НАД, так и с НАДФ, НАД(Ф)-ГДГ; индуцируемая под влиянием ионов аммония, специфичная к НАДФ, НАДФ-ГДГ и также специфичная к НАДФ-ГДГ, которая синтезируется только в присутствии  $\text{NH}_4^+$  и глюкозы. НАД(Ф)-ГДГ и НАДФ-ГДГ были разделены с помощью хроматографии на колонках с ДЭАЭ-целлюлозой и, как было установлено, различаются по своим физико-химическим и кинетическим свойствам (<sup>3, 5</sup>). Особой отличительной чертой индуцируемой НАДФ-ГДГ является возрастание скорости дезаминирования во времени. При этом скорость возрастания снижается с уменьшением pH и резко увеличивается при добавлении НАДФ-Н без снижения максимальной активности. Эти данные указывали на активацию НАДФ-ГДГ, которая происходила медленно под влиянием *L*-глутамата и быстро под влиянием НАДФ-Н. Механизм такой активации интерпретируется как конформационный переход неактивной или малоактивной формы в активную (<sup>6</sup>).

Таблица 1

Влияние *n*-ХМБ на скорость аминирования и дезаминирования индуцируемой НАДФ-ГДГ при оптимальном значении pH

Концентрация <i>n</i> -ХМБ, 10 <sup>6</sup> М	Ингибирование, %	
	аминирование при pH 8,2	дезаминирование при pH 8,7
0	0	0
1,8	—	6,5
3,5	—	53,3
5,3	—	73,3
7,1	23,5	86,7
8,8	54,7	92,6
10,6	64,3	98,7
12,4	71,4	100

В данной работе для дальнейшей характеристики глутаматдегидрогеназ исследовали влияние *n*-хлормеркурибензоата (*n*-ХМБ) и защитное действие субстратов и кофакторов.

Для исследования использовали частично очищенные препараты НАД(Ф)- и НАДФ-ГДГ (<sup>3, 5</sup>), которые не содержали цистеин и оставались стабильными при 4° в течение длительного времени. Активность измеряли на регистрирующем спектрофотометре «Хитачи» EPS-3Т при 25±1° по изменению оптической плотности при 340 мкм, в кюветах с длиной оптического пути 1 см. Реакционная смесь для НАДФ-ГДГ в объеме 3 мл при определении скорости аминирования содержала: 0,05 М трис-НСI-буфер pH 8,2 или 8,7; 1,6·10<sup>-4</sup> М НАДФ-Н, 5·10<sup>-3</sup> М α-кетоглутарат и 8·10<sup>-2</sup> М (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>НРО<sub>4</sub> pH 8,2 или 8,7, а при определении скорости дезаминирования: 0,05 М трис-НСI-буфер pH 8,7; 10<sup>-4</sup> М *L*-глутамат-Na и 5·10<sup>-4</sup> М НАДФ<sup>+</sup>.

Для конститутивной НАД(Ф)-ГДГ состав реакционной смеси был следующим: при измерении скорости аминирования — трис-НСI-буфер pH 8,7 (8,2), 10<sup>-4</sup> М НАД-Н (1,6·10<sup>-4</sup> М НАДФ-Н), 10<sup>-2</sup> М α-кетоглутарат, 8·10<sup>-2</sup> М (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>НРО<sub>4</sub> pH 8,7 (8,2), а при определении скорости дезаминирования — 0,05 М трис-НСI-буфер pH 8,7, 10<sup>-3</sup> М НАД<sup>+</sup>, 5·10<sup>-2</sup> М *L*-глутамат-Na.

Раствор *n*-ХМБ готовили путем интенсивного суспендирования *n*-ХМБ в 0,05 М трис-НСI-буфере pH 9,0, настаивания в течение нескольких часов

и центрифугирования. Концентрацию *n*-ХМБ в растворе рассчитывали по поглощению при 232 мкм с учетом коэффициента молярной экстинкции  $16,9 \cdot 10^3$  (?). Ферментный препарат предварительно предынкубировали

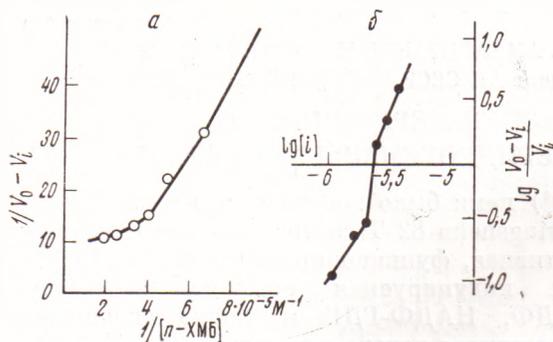


Рис. 1. Характер ингибирования индуцируемой НАДФ-ГДГ *n*-ХМБ. *a* — график двойных обратных величин, *b* — график Хилла.  $V_0$  — исходная активность в отсутствие *n*-ХМБ,  $V_i$  — активность в присутствии *n*-ХМБ

в буфере в присутствии *n*-ХМБ определенной концентрации, затем вносили субстраты и измеряли активность. В случае аминирования реакцию начинали внесением  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , а в случае дезаминирования — НАДФ(Ф)<sup>+</sup>. При исследовании защитного действия субстратов и кофакторов ферментный препарат предынкубировали в присутствии субстрата или кофактора в течение 1 мин., затем добавляли *n*-ХМБ и инкубировали в течение 3 мин., после чего добавляли недостающие субстраты и измеряли скорость реакции.

В табл. 1 представлены результаты ингибирования, аминирования и дезаминирования для индуцируемой НАДФ-ГДГ при оптимальном рН 8,2 и 8,7 соответственно. Видно, что *n*-ХМБ сильно ингибирует НАДФ-ГДГ,

Таблица 2

Ингибирование индуцируемой НАДФ-ГДГ *n*-ХМБ при рН 8,7 и защитное действие субстратов

Субстрат, присутств. при предынкубации	Концентрация <i>n</i> -ХМБ, $10^6$ М	Ингибирование, %	
		аминирование	дезаминирование
—	0	0	0
—	2	42,0	40,0
—	3	72,0	64,0
—	4	85,0	76,0
—	5	91,0	86,0
L-глутамат	4	77,0	66,0
α-Кетоглутарат	4	73,0	—
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4	70,0	—
НАДФ-Н	4	6,0	10,0
НАДФ <sup>+</sup>	4	—	8,0
НАД-Н	4	80,0	76,0

Примечание. Концентрации субстратов были такими, какие использовались для определения активности, т. е. насыщающими.

причем дезаминирование ингибируется значительно сильнее, чем аминирование. Однако, если определять действие *n*-ХМБ на аминирование при том же рН, что и дезаминирование, то степень ингибирования в обоих направлениях оказывается одинаковой (табл. 2). Значительно меньшее ингибирование аминирования при рН 8,2 объясняется или меньшей реакционной способностью SH-групп при этом рН, или их меньшей доступностью, что наиболее вероятно.

Ингибирование *n*-ХМБ носит сильно выраженный кооперативный характер, о чем свидетельствуют график двойных обратных величин и гра-

Таблица 3

Ингибирование *n*-ХМБ конститутивной НАДФ(Ф)-ГДГ и защитное действие субстратов

Субстрат, присутств. при предынкубации	Концентрация <i>n</i> -ХМБ, $10^6$ М	Ингибирование, %		
		аминирование с НАДФ-П (рН 7,8)	аминирование с НАДФ-Н (рН 8,7)	дезаминирование с НАДФ <sup>+</sup> (рН 8,7)
—	0,06	0	0	12,5
—	0,147	0	0	30,0
—	0,300	0	0	37,5
—	0,6	0	0	56,0
—	0,9	—	—	69,0
—	1,47	—	—	86,0
—	2,38	23	22	100
L-глутамат	1,47	—	—	85,0
НАД <sup>+</sup>	1,47	—	—	84,0

фик Хилла, представленные на рис. 1. Из всех субстратов и кофакторов защитное действие оказывает только НАДФ, причем как окисленная, так и восстановленная формы (табл. 2). Степень защиты аминирования и дезаминирования НАДФ-Н одинакова и составляет практически 100%. На основании этих фактов мы полагаем, что *n*-ХМБ присоединяется скорее не в активных центрах, а в аллостерических, в которых присоединяется НАДФ-Н как активатор НАДФ-ГДГ<sup>(6)</sup>. Если бы *n*-ХМБ присоединялся в активных центрах, то защитное действие НАДФ-Н было бы, по-видимому, различным для аминирования и дезаминирования. Кроме того, на связывание *n*-ХМБ на аллостерических центрах указывает также тот факт, что при pH 8,2 ингибирование *n*-ХМБ выражено слабее. А как было показано раньше, активация НАДФ-ГДГ при этом pH тоже происходит медленнее, т. е. при pH 8,2 конформация молекулы такова, что SH-группы в аллостерических центрах менее доступны.

В отличие от индуцируемой НАДФ-ГДГ, конститутивная НАД(Ф)-ГДГ ингибируется *n*-ХМБ значительно слабее. Из табл. 3 видно, что при высоких концентрациях *n*-ХМБ аминирование как с НАД-Н, так и с НАДФ-Н ингибируется лишь незначительно. Однако дезаминирование с НАД<sup>+</sup> подавляется сильнее, по сравнению с аминированием, причем при одном и том же pH 8,7. Кофактор и *L*-глутамат-*Na* не оказывали защитного действия ни в том, ни в другом случае. Однонаправленное действие *n*-ХМБ на НАД(Ф)-ГДГ остается непонятным, равно как непонятны и другие случаи однонаправленного, иногда противоположного, действия различных метаболитов на ферменты, катализирующие двухстороннюю реакцию, в частности на НАД-ГДГ некоторых представителей *Phycomycetes*<sup>(8-12)</sup>.

Если предположить, что катализ реакции в прямом и обратном направлениях осуществляется на различных или частично перекрывающихся участках молекулы фермента, то тогда однонаправленное воздействие легко объясняется. Например, можно представить следующую модель ГДГ, изображенную на рис. 2. Аминирование и дезаминирование осуществляются на различных участках молекулы с соблюдением принципа микроэкономической обратимости. Аминирующий участок имеет большее сродство к субстратам ( $S_1S_1 = P_2P_2$ ) и меньшее к продуктам ( $P_1P_1 = S_2S_2$ ). Поэтому на аминирующем участке равновесие сдвинуто сильно в сторону синтеза глутамата, а на дезаминирующем — в сторону его распада. В этом случае любой метаболит, соединяющийся конкурентно в том или другом участке, может по-разному влиять на аминирование и дезаминирование, равно как и аллостерические эффекторы, если таковые имеются, соединяясь на аллостерическом центре (А), могут вызывать конформационные изменения, по-разному влияющие на скорость аминирования и дезаминирования.

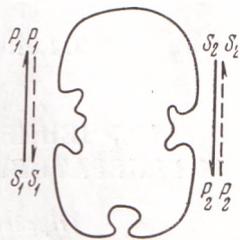


Рис. 2. Схематическое изображение возможной модели ГДГ хлореллы.  $S_1S_1 = P_2P_2 = \alpha$ -кетоглутарат +  $NH_4^+$  + НАД(Ф)-Н +  $H^+$ ;  $P_1P_1 = S_2S_2 = L$ -глутамат + НАД(Ф)<sup>+</sup>

Институт биохимии им. А. Н. Баха  
Академии наук СССР  
Москва

Поступило  
2 I 1974

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> В. Р. Шагилов, З. Г. Евстигнеева, В. Л. Крегович, Биохимия, т. 34, 409 (1969).
- <sup>2</sup> В. Р. Шагилов, Г. С. Калошина, В. Л. Крегович, ДАН, т. 194, 964 (1970).
- <sup>3</sup> В. Р. Шагилов, В. Г. Амбарцумян, В. Л. Крегович, ДАН, т. 207, 1229 (1972).
- <sup>4</sup> В. Р. Шагилов, Р. В. Ванкова и др., ДАН, т. 207, 476 (1972).
- <sup>5</sup> В. Р. Шагилов, В. Г. Амбарцумян, В. Л. Крегович, Биохимия, т. 39, № 4 (1974).
- <sup>6</sup> В. Р. Шагилов, В. Г. Амбарцумян и др., ДАН, т. 215, № 6 (1974).
- <sup>7</sup> P. D. Boyer, J. Am. Soc., v. 76, 4331 (1954).
- <sup>8</sup> H. B. Le'John, R. M. Stevenson, J. Biol. Chem., v. 245, 3890 (1970).
- <sup>9</sup> H. B. Le'John, R. M. Stevenson, R. Menser, J. Biol. Chem., v. 245, 5569 (1970).
- <sup>10</sup> H. B. Le'John, J. Biol. Chem., v. 243, 5126 (1968).
- <sup>11</sup> H. B. Le'John, S. G. Jackson et al., J. Biol. Chem., v. 244, 5346 (1969).
- <sup>12</sup> T. Sanner, Biochim. et biophys. acta, v. 258, 689 (1972).