

УДК 577.158.342

БИОХИМИЯ

В. И. МУРОНЕЦ, Т. О. ГОЛОВИНА, Н. Д. ВОСПЕЛЬНИКОВА,  
М. И. САФРОНОВА, Н. К. НАГРАДОВА

# О ДВУХ МЕХАНИЗМАХ ОБРАТИМОЙ ИНАКТИВАЦИИ D-ГЛИЦЕРАЛЬДЕГИД-3-ФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ

(Представлено академиком С. Е. Севериным 15 IX 1975)

Диссоциация тетрамерной молекулы D-глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (D-глицеральдегид-3-фосфат : НАД оксидоредуктаза (фосфорилирующая) 1.2.1.12) на субъединицы может быть вызвана различными воздействиями (<sup>1-4</sup>), приводящими к потере ферментативной активности. В ряде случаев (<sup>5-7</sup>) процесс инактивации и диссоциации оказывается легко обратимым. Исследование механизмов, лежащих в основе диссоциации в мягких условиях, представляет интерес для выяснения природы межсубъединичных контактов в олигомере.

Апо-глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа из скелетных мышц крысы подвержена обратимой инактивации и диссоциации при охлаждении в присутствии 0,15 M NaCl (<sup>8</sup>) либо при инкубации при комнатной температуре в присутствии адениновых нуклеотидов (<sup>9</sup>). В настоящей работе мы рассматриваем некоторые характеристики обоих типов инактивации, показывающие, что она осуществляется в этих случаях по разным механизмам.

Апо-глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу из мышц крысы получали по ранее описанной методике (<sup>8, 10</sup>). Карбоксиметилирование фермента проводили, добавляя к 0,8–1,0 мг белка в 1 мл 0,15 M NaCl, содержащего 3 mM дитиотреитол, иодацетат (5-кратный молярный избыток по отноше-

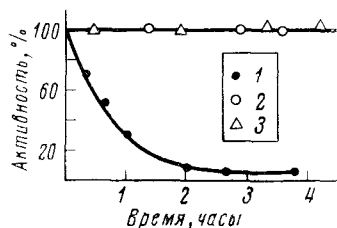


Рис. 1

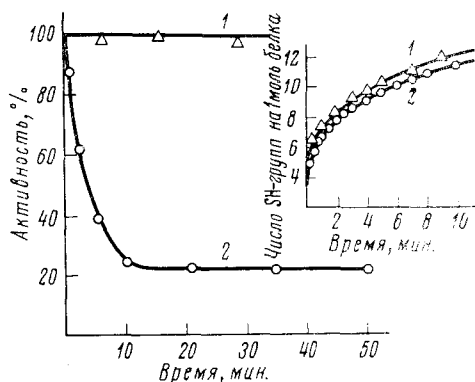


Рис. 2

Рис. 1. Холодовая инактивация апо-глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы. 1 – инкубация фермента в 0,15 M NaCl в отсутствие фосфата при 4°, 2 – при 25°, 3 – после добавления 0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> при 4°

Рис. 2. Инактивация апо-глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы в присутствии АДФ. 1 – инкубация фермента при 25° в фосфатном буфере без АДФ, 2 – в присутствии 10 mM АДФ. Справа: 1 – титрование SH-групп фермента ДТНБ после 20-минутной инкубации белка при 25° в фосфатном буфере без АДФ, 2 – в присутствии 10 mM АДФ. Количество SH-групп определяли как указано в тексте, то же и для рис. 3

нию к общему числу SH-групп фермента и 2,5-кратный избыток по отношению к количеству дитиотреитола). После инкубации при 20° в течение определенного времени фермент освобождался от низкомолекулярных соединений. Количество карбоксиметильных остатков, включившихся

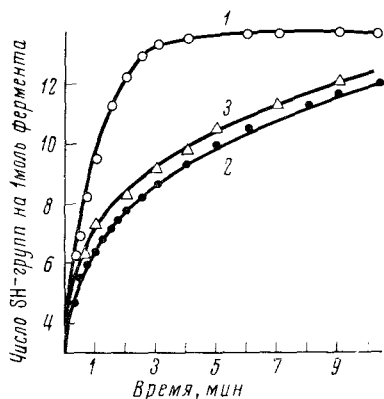


Рис. 3. Титрование SH-групп апо-глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы в разных условиях. 1 — титрование при 25° в 0,19 М NaCl, 2 — в 0,13 М NaCl в присутствии 10 мМ АДФ, 3 — в 0,073 М Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Ионная сила всех буферов 0,19

АДФ в 50 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (5 мМ ЭДТА, pH 7,8). Быстрая инактивация, развивающаяся при выдерживании фермента в растворе нуклеотида, наблюдается при комнатной температуре. В отличие от того, что имеет место в случае холодовой инактивации в присутствии NaCl, добавление неорганического фосфата не предотвращает инактивацию.

Эти наблюдения позволяют предположить разный характер изменений структур, ответственных за холодовую инактивацию фермента, с одной стороны, и за нуклеотидзависимую инактивацию — с другой. Результаты проведенного нами исследования реактивности SH-групп фермента находятся в соответствии с этим предположением. Как видно из рис. 3, природа аниона оказывает существенное влияние на скорость взаимодействия SH-групп дегидрогеназы с ДТНБ: в присутствии фосфата SH-группы становятся менее доступными модификации. На рисунке показано также, что АДФ обладает сходным с фосфатом эффектом на реактивность SH-групп фермента.

Можно полагать, что предпосылкой холодовой инактивации в присутствии NaCl являются конформационные изменения, затрагивающие микроокружение цистеиновых остатков молекулы и предотвращаемые в присутствии таких лигандов, как неорганический фосфат или АДФ. Это объясняет защитный эффект фосфата, показанный на рис. 1. Мы наблюда-

в белок, определяли на аминокислотном анализаторе. Титрование SH-групп проводили по методу Элмана (<sup>11</sup>). К белку в концентрации 0,3 мг/мл добавляли 40-кратный избыток 5',5-дитиобис-2-нитробензоата (ДТНБ) и определяли количество SH-групп по нарастанию оптической плотности при 412 нм. Молекулярный вес белка принимали равным 140 000. Условия определения ферментативной активности описаны в предыдущих публикациях (<sup>8</sup>).

Рис. 1 показывает ход инактивации апофермента (концентрация белка 1,2 мг/мл) при его выдерживании в 0,15 М NaCl (5 мМ ЭДТА, 1 мМ дитиотреитола, pH 7,2) при 4°. Из рисунка видно, что повышение температуры до 20° полностью предотвращает инактивацию. Инактивация не развивается даже при охлаждении, если раствор фермента содержит неорганический фосфат. На рис. 2 изображено падение активности апо-глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (концентрация белка 0,3 мг/мл) в присутствии

Таблица 1  
Карбоксиметилирование цистеиновых остатков апо-глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы. (Фермент выдерживали в 0,15 М NaCl при 20°(А) или при 4°(Б))

| Условия карбоксиметилирования |             | Число остатков карбоксиметил-цистеина на 1 моль белка (мол. вес 140 000) |       |
|-------------------------------|-------------|--------------------------------------------------------------------------|-------|
| pH                            | время, мин. | А                                                                        | Б     |
| 7,2                           | 15          | — *                                                                      | 2,72  |
| 7,4                           | 90          | — *                                                                      | 3,89  |
| 8,0                           | 20          | 7,3                                                                      | 6,6   |
| 8,0                           | 30          | 8,26                                                                     | 9,18  |
| 8,0                           | 90          | 10,5                                                                     | 10,85 |
| 8,4                           | 75          | — *                                                                      | 16,0  |
| 8,7                           | 90          | 16,9                                                                     | — *   |

\* Число карбоксиметил-цистеиновых остатков не определяли.

ли также (неопубликованные данные) защитный эффект АДФ от инактивации данного типа.

Так как необходимым условием NaCl-зависимой инактивации является охлаждение, возникает вопрос о влиянии этого фактора на состояние сульфгидрильных групп фермента. В табл. 1 суммированы результаты анализа реакционной способности SH-групп дегидрогеназы, подвергнутой выдерживанию в растворе NaCl при комнатной температуре (когда активность полностью сохраняется, см. рис. 1) и при 4° в течение времени, достаточного для 90% инактивации.

Из табл. 1 видно, что повышение pH приводит к увеличению доступности SH-групп фермента карбоксиметилированию, так что при pH 8,4–8,7 модификации подвергаются все цистеиновые остатки молекулы. Карбоксиметилирование 16 SH-групп на 1 моль белка в отсутствие денатурирующих агентов свидетельствует о значительной конформационной лабильности глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы из мышц крысы. Таблица показывает, что степень доступности SH-групп при разных значениях pH среды заметно не отличается в случае фермента, выдержанного в NaCl при 20° или при 4° соответственно.

Небольшие отличия в реакционной способности SH-групп между этими препаратами были обнаружены, однако, при титровании с помощью ДТНБ. В соответствии с ранее опубликованными данными<sup>(12)</sup>, результаты свидетельствовали о некотором увеличении скорости модификации SH-групп у фермента, подвергнутого холодовой инактивации. Таким образом, характерной особенностью инактивации глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы, наступающей в присутствии NaCl, является лабилизация структуры тех участков молекулы, которые содержат цистеиновые остатки. Эта лабилизация сама по себе не связана с потерей ферментативной активности (она происходит при выдерживании фермента при 20°), однако служит необходимой предпосылкой инактивации, наступающей на холоду. Эта последняя сопровождается небольшим дополнительным изменением микроструктуры цистеиновых остатков, что сказывается на скорости их взаимодействия с ДТНБ<sup>(12)</sup>.

Ранее мы показали, что холодовая инактивация дегидрогеназы в присутствии NaCl есть следствие диссоциации олигомера на субъединицы<sup>(8)</sup>, поэтому можно думать, что непосредственной причиной инактивации в данном случае является ослабление гидрофобных взаимодействий, наступающее на холоду, предпосылкой которого явились анионзависимые структурные сдвиги.

Любой агент, способный предотвратить эти сдвиги, окажется эффективным в защите от холодовой инактивации. Помимо фосфата, защиту от холодовой инактивации фермента оказывает АДФ в силу сходного с фосфатом влияния на микроокружение SH-групп (рис. 3). Мы полагаем, что ранее описанное нами защитное влияние НАД от NaCl-зависимой холодовой инактивации<sup>(8)</sup> также обусловлено его воздействием на первую стадию этого процесса.

Иной механизм лежит, по-видимому, в основе инактивации и диссоциации фермента в присутствии АДФ (и других адениловых нуклеотидов). В этом случае структурные изменения, ведущие к инактивации, не затрагивают окружения цистеиновых остатков; рис. 2 показывает одинаковую скорость взаимодействия с ДТНБ SH-групп нативного фермента и инаktivированного в присутствии АДФ. Нуклеотидзависимая инактивация происходит при комнатной температуре и, вероятно, обусловлена локальными конформационными сдвигами, индуцируемыми присоединением нуклеотида в коэнзимсвязывающем участке молекулы.

Характер зависимости степени инактивации от концентрации фермента позволяет заключить, что потеря активности обусловлена диссоциацией тетрамерной молекулы дегидрогеназы на димеры, неактивные в присутствии нуклеотида<sup>(9)</sup>. Как и при NaCl-зависимой холодовой инактивации,

предпосылкой диссоциации, вероятно, служит ослабление межсубъединичных контактов в олигомере, обусловленное в данном случае связыванием нуклеотида.

Мы полагаем, что оба типа обратной инактивации глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы включают две стадии: 1) переход тетрамера в «метастабильное» состояние, при котором сохраняется энзиматическая активность и четвертичная структура фермента, однако межсубъединичные контакты ослаблены, 2) диссоциацию, ведущую к инактивации и являющуюся следствием разрыва этих контактов. Результаты настоящего исследования показывают, что переход в «метастабильное» состояние осуществляется разными путями в случае NaCl-зависимой и нуклеотидзависимой инактивации.

Московский государственный университет  
им. М. В. Ломоносова

Поступило  
2 IX 1975

#### ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> W. F. Harrington, G. M. Karr, J. Mol. Biol., v. 13, 885 (1965). <sup>2</sup> J. Shibata, M. J. Kronman, Arch. Biochem. and Biophys., v. 118, 410 (1967). <sup>3</sup> R. Jaenicke, D. Schmid, S. Knof, Biochemistry, v. 7, 919 (1968). <sup>4</sup> E. A. Meighen, H. K. Schachman, Biochemistry, v. 9, 1177 (1970). <sup>5</sup> S. M. Constantides, W. C. Deal jr., J. Biol. Chem., v. 244, 5695 (1969). <sup>6</sup> S. M. Constantides, W. C. Deal jr., J. Biol. Chem., v. 245, 246 (1970). <sup>7</sup> C. D. Smith, H. K. Schachman, Biochemistry, v. 10, 4576 (1971). <sup>8</sup> N. K. Nagradova, V. I. Muronetz et al., Biochim. et biophys. acta, v. 377, 15 (1975). <sup>9</sup> N. K. Nagradova, T. O. Golovina, A. T. Mevkh, FEBS Letters, v. 49, 242 (1974). <sup>10</sup> B. И. Муронец, Т. О. Головина и др., Биохимия, т. 40, 416 (1975). <sup>11</sup> G. L. Ellman, Arch. Biochem. and Biophys., v. 82, 70 (1959). <sup>12</sup> Н. К. Наградова, М. К. Гусева и др., Биохимия, т. 38, 145 (1973).