



Doctoral Thesis

## **Untersuchung der cytosolischen Aspartat-Aminotransferase auf Untereinheiten-Wechselwirkungen Bestimmung des Besetzungsmusters der aktiven Stellen im Transaminierungsgleichgewicht**

**Author(s):**

Schlegel, Hansjörg

**Publication Date:**

1977

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000204033> →

**Rights / License:**

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. Nr. 5986

**UNTERSUCHUNG DER CYTOSOLISCHEN  
ASPARTAT-AMINOTRANSFERASE  
AUF UNTEREINHEITEN-WECHSELWIRKUNGEN**

Isolierung und Charakterisierung von Hybrid-Dimeren  
aus einer enzymatisch aktiven und einer inaktiven Untereinheit  
Bestimmung des Besetzungsmusters der aktiven Stellen  
im Transaminierungsgleichgewicht

**ABHANDLUNG**  
zur Erlangung  
des Titels eines Doktors der Naturwissenschaften  
der  
Eidgenössischen Technischen Hochschule Zürich

vorgelegt von

**HANSJÖRG SCHLEGEL**  
dipl. Natw. ETH  
geboren am 29. März 1948  
von Buchs (Kt. St. Gallen)

Angenommen auf Antrag von  
Prof. Dr. C. Martius, Referent  
Prof. Dr. Ph. Christen, Korreferent

1977

## 1. SUMMARY

---

Aspartate aminotransferase ( $\alpha$ -subform from pig heart cytosol), a dimeric enzyme composed of two identical subunits, was tested for functionally important subunit interactions. Two experimental approaches were chosen: (1) studies with isolated hybrid dimers containing one active and one inactive subunit (apo or with reduced internal aldimine); (2) determination of the active site occupancy pattern in the native enzyme at transamination equilibrium. The two functional variants of the enzyme arising from its double displacement mechanism, i.e., the pyridoxal-5'-P form and the pyridoxamine-5'-P form, as well as the apo enzyme and the enzyme whose aldimine bonds to pyridoxal-5'-P had been reduced with sodium borohydride were found to be separable by isoelectric focusing in a shallow pH gradient.

The apo/holo hybrid dimer of cytosolic aspartate aminotransferase from pig heart was compared with the apo/apo and holo/holo homomer with respect to manifestations of subunit interactions. The hybrid dimer was isolated by isoelectric focusing from an apo enzyme preparation semi-reconstituted with pyridoxal-5'-P. The binomial distribution pattern of pyridoxal/pyridoxal homomer, apo/pyridoxal hybrid, and apo/apo homomer obtained by the isoelectric separation as well as the identical rates of binding of the coenzyme to the apo/holo hybrid and the apo/apo homomer demonstrate random association of the coenzyme with the apo subunits.

An extensive comparative exploration of the active site regions of the apo/holo hybrid revealed no differences with respect to the following structural and functional properties: catalytic center activity, absorption and circular dichroism spectra of the coenzyme chromophore,  $pK_a'$  values of

enzyme-bound pyridoxal-5'-P,  $K_m'$  and  $V_{max}'$  values for aspartate and 2-ketoglutarate, the dissociation constants of the complex with competitive dicarboxylic inhibitors, the absorption spectrum, and the rate of decay of the intermediate with erythro-3-hydroxyaspartate. The rate of modification of the amino acid residue Cys 390 with N-ethylmaleimide was found to be about 20 times faster in the apo/apo homomer than in the pyridoxal/pyridoxal homomer indicating a coenzyme-induced difference in conformation. The rates of modification of the apo and of the pyridoxal subunit in the hybrid, however, are the same as those in the respective homomers; apparently, the coenzyme-induced conformational change is not transmitted to the environment of Cys 390 on the adjoining subunit. Likewise, the syncatalytic changes in conformation of the holo subunit induced by the addition of a transaminating substrate pair do not affect the reactivity of Cys 390 on the adjoining apo subunit.

On heat treatment the apo/apo homomer is about 50 times more rapidly denatured than the pyridoxal homomer when the progress of denaturation is followed by both the enzymatic activity and the ellipticity at 220 nm. Comparison of the denaturation of the apo/pyridoxal hybrid with that of the homomers shows that pyridoxal subunits enhance the kinetic thermal stability of both an adjoining apo subunit and an adjoining pyridoxal subunit. Apparently, coenzyme-induced changes in conformation are transmitted across the subunit interface; they exempt, however, the active site region and the environment of Cys 390 of the adjoining subunit.

Isoelectric focusing of a half-reduced pyridoxal-5'-P enzyme preparation yielded a 1 : 2 : 1 distribution of pyridoxal homomer, pyridoxal/reduced hybrid, and reduced homomer. The enzymatic activity of the isolated pyridoxal/reduced hybrid with one catalytically active and one inactive subunit is

exactly half of that of the native pyridoxal homomer. Its absorption spectrum corresponds to the arithmetical mean of those of the pyridoxal and reduced homomer.

The active site occupancy pattern, i.e. the relative concentrations of pyridoxal homomer, pyridoxal/reduced hybrid and reduced homomer in a population of aspartate aminotransferase dimers at transamination equilibrium, was determined employing reduction with sodium borohydride as a means to label irreversibly the pyridoxal subunits. The substrate pair 2-ketoglutarate and glutamate in a concentration ratio appropriate to result in the formation of equimolar concentrations of pyridoxal and pyridoxamine subunits was added to a solution of the enzyme. After removal of the substrates to sub-stoichiometric concentrations, the pyridoxal homomer, pyridoxal/pyridoxamine hybrid, pyridoxamine homomer dimer mixture was reduced with sodium borohydride to a reduced homomer, reduced/pyridoxamine hybrid, pyridoxamine homomer dimer mixture. In this way, contaminating traces of substrates were prevented from mediating the mutual transamination of pyridoxal and pyridoxamine subunits, which would shift the original concentration ratio of the different dimer species during the isoelectric separation. Since the isoelectric points of the reduced and the pyridoxamine homomer are nearly equal, the reduced homomer, reduced/pyridoxamine hybrid, pyridoxamine homomer mixture were converted to a readily separable reduced homomer, reduced/pyridoxamine hybrid, pyridoxamine homomer mixture by addition of excess 2-ketoglutarate. Subsequent isoelectric focusing yielded a 1 : 2 : 1 distribution of pyridoxal homomer (originally pyridoxamine homomer), pyridoxal/reduced hybrid (originally pyridoxamine/pyridoxal hybrid) and reduced homomer (originally pyridoxal homomer). The binomial active site occupancy pattern demonstrates random interconversion of the individual pyridoxal and pyridoxamine subunits of the enzyme dimers during transamination,

i.e. independent catalytic function of the two active sites of the aspartate aminotransferase dimer.

The results of the present extensive exploration were fully compatible with mutually independent catalytic function of the two subunits of aspartate aminotransferase. Structural stabilization by coenzym-dependent subunit interactions thus seems to be the only detectable consequence of the oligomeric structure of cytosolic aspartate aminotransferase.

## ZUSAMMENFASSUNG

---

Die cytosolische Aspartat-Aminotransferase ( $\alpha$ -Subform aus Schweineherz), ein dimeres Enzym mit identischen Untereinheiten, wurde auf funktionell wichtige Untereinheiten-Wechselwirkungen untersucht. Die Fragestellung wurde auf zwei verschiedenen experimentellen Wegen angegangen: (1) Untersuchung von isolierten Hybriddimeren, die eine aktive und eine inaktive Untereinheit (apo oder mit reduziertem internen Aldimin) aufweisen; (2) Bestimmung des Besetzungsmusters der aktiven Stellen des nativen Holodimers im Transaminierungsgleichgewicht.

Die beiden auf den "double displacement" Mechanismus des Enzyms zurückzuführenden funktionellen Varianten, d.h. die Pyridoxalform und die Pyridoxaminform, wie auch das Apoenzym und das Enzym mit reduziertem internen Aldimin lassen sich durch isoelektrische Fokussierung in einem flachen pH Gradienten voneinander trennen. Das apo/holo Hybriddimer wurde im Hinblick auf Manifestationen von Untereinheiten-Wechselwirkungen mit dem apo/apo und dem holo/holo Homomer verglichen. Das Hybriddimer konnte durch isoelektrische Fokussierung einer Apoenzympräparation, die mit Pyridoxal-5'-phosphat zur Hälfte rekonstituiert worden war, isoliert werden. Das binomiale Verteilungsmuster von Pyridoxalhomomer, apo/pyridoxal Hybrid und Apohomomer nach der isoelektrischen Trennung und die identischen Geschwindigkeiten der Bindung des Coenzym an das apo/pyridoxal Hybrid, respektive an das Apohomomer zeigen, dass sowohl im Hybrid als auch im Homomer das Coenzym nach statistischen Gesetzmässigkeiten an die Apo-untereinheit bindet. Ein ausführlicher Vergleich des Bereichs der aktiven Stellen des apo/pyridoxal Hybrids (das eine aktive Stelle enthält) und des Pyridoxalhomomers (das zwei aktive Stellen enthält) zeigte keine Unterschiede in den folgenden strukturellen und funktionellen Parametern: katalytische Aktivität der

aktiven Stelle, Absorptions- und Zirkulärdichroismus-Spektren des Coenzymchromophors,  $pK_S$ '-Werte des enzymgebundenen Pyridoxal-5'-phosphats,  $K_m$ '- und  $V_{max}$ '-Werte für Aspartat und 2-Ketoglutarat, die Dissoziationskonstanten des Komplexes mit kompetitiven Dicarbonsäureinhibitoren, das Absorptionsspektrum und die Zerfallsgeschwindigkeit der Zwischenverbindung mit erythro-3-Hydroxyaspartat. Die Geschwindigkeit der Modifikation des Aminosäurerests Cys 390 mit N-Aethylmaleinimid ist im Apohomomer ungefähr 20-mal grösser als im Pyridoxalhomomer. Dieser Unterschied ist offenbar auf eine Coenzym-induzierte Verschiedenheit der Konformation zurückzuführen. Die Modifikationsgeschwindigkeiten der Apo- und der Pyridoxaluntereinheit im Hybrid sind jedoch dieselben wie in den entsprechenden Homomeren. Offenbar wird der Coenzym-induzierte Konformationsunterschied nicht auf die Umgebung des Aminosäurerests Cys 390 der benachbarten Untereinheit übertragen. Analogerweise haben synkatalytische Konformationsänderungen der Holountereinheit, ausgelöst durch das transaminierende Substratpaar, keinen Einfluss auf die Reaktivität des Aminosäurerests Cys 390 der benachbarten Apountereinheit.

Das Apohomomer wird ungefähr 50-mal schneller durch Hitze denaturiert als das Holohomomer. Die Denaturierung wurde anhand des Verlusts an enzymatischer Aktivität (respektive Rekonstituierbarkeit) und der Elliptizität bei 220 nm verfolgt. Der Vergleich der Denaturierungsgeschwindigkeiten des apo/pyridoxal Hybrids mit derjenigen der Homomeren zeigt, dass Pyridoxaluntereinheiten die kinetische thermische Stabilität benachbarter Apo- und Pyridoxaluntereinheiten erhöhen. Offenbar werden Coenzym-induzierte Konformationsänderungen über die Kontaktfläche auf die benachbarte Untereinheit übertragen; sie haben jedoch keinen Einfluss auf die aktive Stelle und auf die Umgebung des Aminosäurerests Cys 390 der benachbarten Untereinheit.

Isoelektrische Fokussierung einer zur Hälfte reduzierten Pyridoxalenzympräparation ergibt eine 1 : 2 : 1 Verteilung von



Pyridoxalhomomer, pyridoxal/reduziert Hybrid und reduziertem Homomer. Die enzymatische Aktivität des isolierten Hybrids mit einer katalytischen aktiven und einer inaktiven Untereinheit entspricht genau der Hälfte derjenigen des nativen Pyridoxalhomomers. Das Besetzungsmuster der aktiven Stellen, d.h. die relativen Konzentrationen von Pyridoxalhomomer, pyridoxal/pyridoxamin Hybrid und Pyridoxaminhomomer in einer Population von Aspartat-Aminotransferase-Dimeren im Transaminierungsgleichgewicht, wurde bestimmt, indem die Pyridoxaluntereinheiten durch Reduktion mit Natriumborhydrid irreversibel modifiziert wurden. Das Substratpaar 2-Ketoglutarat und Glutamat wurde in einem solchen Konzentrationsverhältnis zu einer Enzymlösung gegeben, dass äquimolare Konzentrationen von Pyridoxal- und Pyridoxaminuntereinheiten gebildet wurden. Nach dem Abtrennen der Substrate bis auf sub-stöchiometrische Konzentrationen wurde die Pyridoxalhomomer, pyridoxal/pyridoxamin Hybrid, Pyridoxaminhomomer Dimermischung mit Natriumborhydrid zu einer reduzierten Homomer, reduziert/pyridoxamin Hybrid, Pyridoxaminhomomer Dimermischung reduziert. Dadurch konnte die durch kontaminierende Substrate vermittelte gegenseitige Transaminierung von Pyridoxal- und Pyridoxaminuntereinheiten, die das ursprüngliche Konzentrationsverhältnis während der isoelektrischen Trennung verändern würden, ausgeschaltet werden. Weil die isoelektrischen Punkte des reduzierten und des Pyridoxaminhomomers beinahe gleich sind, wurde die reduzierte Homomer, reduziert/pyridoxamin Hybrid, Pyridoxaminhomomer Mischung durch Zugabe eines Ueberschusses von 2-Ketoglutarat in die leicht trennbare reduzierte Homomer, reduziert/pyridoxal Hybrid, Pyridoxalhomomer Mischung übergeführt. Die anschliessende isoelektrische Fokussierung ergab eine 1 : 2 : 1 Verteilung von Pyridoxalhomomer (ursprünglich Pyridoxaminhomomer), pyridoxal/reduziert Hybrid (ursprünglich pyridoxamin/pyridoxal Hybrid) und reduziertem Homomer (ursprünglich Pyridoxalhomomer). Das binomiale Besetzungsmuster der aktiven Stellen zeigt, dass die einzelnen Pyridoxal- und Pyridoxamin-Untereinheiten des Enzymdimers während der Transaminierung nach statistischen Gesetzmässigkeiten

ineinander übergeführt werden, d.h. dass die beiden aktiven Stellen des Aspartat-Aminotransferase Dimers ihre katalytische Funktion unabhängig voneinander ausüben.

Alle in dieser umfassenden Untersuchung gewonnenen Daten sind ohne Ausnahme vereinbar mit einer gegenseitig unabhängigen katalytischen Funktion der Untereinheiten. Die strukturelle Stabilisierung durch Coenzym-induzierte Untereinheiten-Wechselwirkungen scheint demnach die einzige feststellbare Konsequenz der oligomeren Struktur der cytoplasmatischen Aspartat-Aminotransferase zu sein.