

Շ. Մ. ՆԵՐՏԻՏՅԱՆ, Ա. Յ. ԱՐՄԵՆՅԱՆ

ДЕЙСТВИЕ ТИОЛОВЫХ РЕАГЕНТОВ НА АМФ- И АДФ-АМИНО- ГИДРОЛАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ МОЗГОВОЙ ТКАНИ

В статье приведены данные относительно неодинакового действия ряда тиоловых реагентов и некоторых тиолов на образование аммиака из АДФ и АМФ растворимой фракции мозга крыс. Эти исследования свидетельствуют о различной реакционной способности SH-групп в АДФ- и АМФ-аминогидролазе мозговой ткани.

Нашими предыдущими исследованиями установлено непосредственное деаминирование АДФ в мозговой ткани [1, 3, 9].

Прямое деаминирование АДФ было описано также рядом исследователей в отношении мышечной ткани [7, 19] и костного мозга [6].

Нами отмечен ряд отличительных особенностей ферментативных механизмов деаминирования АМФ и АДФ в мозговой ткани. Показано, что различные ингибиторы — Zn, Cd, Ni, NaF и др. — неодинаково действуют на продуцирование аммиака из АМФ и АДФ в мозговой ткани.

Установлено также, что АДФ-аминогидролаза имеет оптимум pH 7,5 и локализована исключительно в растворимой фракции. АМФ-аминогидролазная активность сосредоточена главным образом в растворимой фракции и отчасти в ядрах и митохондриях, ее оптимум pH 6,4 [2]. Этими же исследованиями выявлено, что продуцирование аммиака в гиалоплазме мозга крыс из АМФ стимулируется АТФ, в отличие от АДФ-аминогидролазы, на которую АТФ не действует [2].

Неодинаковое действие на эти ферменты оказывает ИДФ, который активирует АМФ-аминогидролазу и ингибирует АДФ-аминогидролазную активность (неопубликованные данные).

В настоящей статье приводятся новые данные, свидетельствующие о том, что образование аммиака из АМФ и АДФ в мозговой ткани осуществляется различными ферментами.

Методика. Опыты проводили на белых крысах. Для получения растворимой фракции 10% гомогенат мозга центрифугировали при 105.000 g в течение 60 мин.

Аммиак определяли микродиффузионным методом [4], белок — по Лоури и сотр. [11], неорганический фосфат — по методу Лоури и Лопес [12] в модификации Пилз и Лохмана [14].

Результаты исследований и их обсуждение. В опытах, которые были поставлены на растворимой фракции мозговой ткани, изучалось влияние тиоловых реагентов на АМФ- и АДФ-аминогидролазную активность. Для идентификации тиоловых групп, обуславливающих активность обо-

Таблица 1

Влияние тиоловых реагентов на АМФ- и АДФ-аминогидролазную активность растворимой фракции мозговой ткани, мкг аммиака на пробу

АМФ	АМФ+N-ЭМ (10^{-4} М)	АМФ+N-ЭМ (10^{-3} М)	АМФ+N-ЭМ ($5 \cdot 10^{-3}$ М)	АМФ+МК (10^{-4} М)	АМФ+МК ($5 \cdot 10^{-3}$ М)	АМФ+ПХМБ (10^{-4} М)	АМФ+ПХМБ ($5 \cdot 10^{-4}$ М)	АМФ+Cd $^{++}$ (10^{-5} М)	АМФ+Cd $^{++}$ (10^{-4} М)	АМФ+МЙУК (10^{-3} М)	АМФ+N-БСИ (10^{-4} М)	АМФ+N-БСИ (10^{-3} М)
45,5	66,9	94,4	95,9	56,5	17,8	66,7	14,2	61,2	5,0	38,9	65,0	13,0
АДФ	АДФ+N-ЭМ (10^{-4} М)	АДФ+N-ЭМ (10^{-3} М)	АДФ+N-ЭМ ($5 \cdot 10^{-3}$ М)	АДФ+МК (10^{-4} М)	АДФ+МК ($5 \cdot 10^{-3}$ М)	АДФ+ПХМБ (10^{-4} М)	АДФ+ПХМБ ($5 \cdot 10^{-4}$ М)	АДФ+Cd $^{++}$ (10^{-5} М)	АДФ+Cd $^{++}$ (10^{-4} М)	АДФ+МЙУК (10^{-3} М)	АДФ+N-БСИ (10^{-4} М)	АДФ+N-БСИ (10^{-3} М)
60,4	43,6	43,8	24,8	56,9	33,2	59,1	5,7	54,2	54,8	57,1	60,0	10,0

Средние данные 10 опытов.

Объем реакционной смеси 2 мл: 1 мл экстракта мозговой ткани (количество, соответствующее 100 мг свежей ткани), 0,5 мл 0,2 М ТРИС—НСI буфера рН 6,4 (в пробах с АМФ) и 7,4 (в пробах с АДФ), 0,2 мл раствора, содержащего 10 мкмоль АМФ или АДФ и 0,3 мл раствора, содержащего соответствующий тиоловый реагент. Инкубация—60 мин при 37°C.

их ферментов, мы изучали влияние тиоловых реагентов различной степени специфичности. В первой серии опытов с этой целью использовались N-этилмид малеиновой кислоты (N-ЭМ), малеиновая кислота (МК), парахлормеркурибензоат (ПХМБ), ионы кадмия (Cd^{++}), моноiodоксусная кислота (МИУК) и N-бромсукцинамид (N-БСИ).

Из табл. 1 видно, что эти реагенты неодинаково влияют на продукцию аммиака из АМФ и АДФ. Судя по приведенным данным, N-ЭМ в концентрации 10^{-4} М значительно стимулирует АМФ-аминогидролазную активность. При использовании этого реагента в концентрации 10^{-3} М и $5 \cdot 10^{-3}$ М наблюдается более чем двукратное увеличение активности фермента. Между тем N-ЭМ в концентрации 10^{-4} М, 10^{-3} М и $5 \cdot 10^{-3}$ М вызывает падение АДФ-аминогидролазной активности на 27,8, 27,5 и 59% соответственно. Из этой же таблицы видно, что МК и ПХМБ в концентрации 10^{-4} М и 10^{-5} М также приводят к повышению активности АМФ-аминогидролазы, однако в незначительной мере по сравнению с N-ЭМ, и почти не влияют на АДФ-аминогидролазную активность. Аналогичное действие на АМФ-аминогидролазную активность оказывает N-БСИ в концентрации 10^{-4} М. Следует отметить, что N-БСИ, специфически окисляющий остатки триптофала в белковой молекуле фермента, может модифицировать и другие функциональные группы, в том числе и SH-группы [18]. Как видно из приведенной таблицы, большинство тиоловых реагентов и N-БСИ в относительно высоких концентрациях вызывают инактивацию обоих ферментов. Однако Cd^{++} в концентрации 10^{-4} М, резко подавляя АМФ-аминогидролазную активность, почти не действует на АДФ-аминогидролазную активность. МИУК не вызывает существенных изменений в активности обоих ферментов.

В следующей серии опытов исследовалось влияние некоторых тиоловых соединений и дисульфидов на АМФ- и АДФ-аминогидролазную активность растворимой фракции мозговой ткани.

Таблица 2

Действие тиоловых соединений на АМФ- и АДФ-аминогидролазную активность растворимой фракции мозга, мкг аммиака на пробу

АМФ	АМФ + 2-меркаптоэтанол ($5 \cdot 10^{-3}$ М)	АМФ + тиогликолевая к-та ($5 \cdot 10^{-3}$ М)	АМФ + БАЛ ($5 \cdot 10^{-3}$ М)
43,0	33,0	35,0	28,0
АДФ	АДФ + 2-меркаптоэтанол ($5 \cdot 10^{-3}$ М)	АДФ + тиогликолевая к-та ($5 \cdot 10^{-3}$ М)	АДФ + БАЛ ($5 \cdot 10^{-3}$ М)
62,0	60,0	61,0	34,0

Средние данные 8 опытов.

Условия опытов в этой и последующих таблицах те же, что и в табл. 1.

Из табл. 2 видно, что 2-меркаптоэтанол и тиогликолевая кислота несколько ингибируют АМФ-аминогидролазную активность и не влияют на продуцирование аммиака из АДФ.

Таблица 3

Влияние дисульфидов на АМФ- и АДФ-аминогидролазную активность мозговой ткани, мкг аммиака на пробу

АМФ	АМФ+цистин ($5 \cdot 10^{-3}$ М)	АМФ+глутатион-S-S ($5 \cdot 10^{-3}$ М)	АМФ+ДТНБ (10^{-3} М)
40,0	50,0	54,0	30,0
АДФ	АДФ+цистин ($5 \cdot 10^{-3}$ М)	АДФ+глутатион-S-S ($5 \cdot 10^{-3}$ М)	АДФ+ДТНБ (10^{-3} М)
58,0	58,0	57,0	27,0

Средние данные 8 опытов.

Таблица 4

Активность АДФ-аминогидролазы, прединкубированной и N-ЭМ и ДТНБ, мкг аммиака на пробу

АДФ	Фермент + N-ЭМ (10^{-3} М) прединкуб. 30 мин + АДФ	Фермент + ДТНБ (10^{-3} М) прединкуб. 30 мин + АДФ
60,0	6,5	9,6

Средние данные 6 опытов.

Заметное ингибирующее действие на АМФ-аминогидролазную активность оказывает 2,3-димеркаптопропанол (БАЛ), причем в отличие от применяемых монотиолов он ингибирует также образование аммиака из АДФ.

Данные, приведенные в табл. 3, показывают, что цистин и окисленный глутатион несколько активируют АМФ-аминогидролазную активность и не оказывают влияния на образование аммиака из АДФ.

5,5'-дитиобис (2-нитробензойная кислота ДТНБ) ингибирует продуцирование аммиака из обоих нуклеотидов, причем в большей степени из АДФ (Табл. 4).

Интересно отметить, что при прединкубации растворимой фракции с ДТНБ и последующем добавлении АДФ так же, как и в опытах с N-ЭМ, ингибирующее влияние этих реагентов на активность фермента усугублялось.

АДФ-аминогидролазная активность под влиянием N-ЭМ в концентрации 10^{-3} М в присутствии АДФ подавляется приблизительно на 30%, прединкубация же растворимой фракции с N-ЭМ и последующее

добавление субстрата приводит почти к полной потере ферментативной активности. Аналогичная картина наблюдалась и в опытах с прединкубацией растворимой фракции в присутствии ДТНБ.

Эти данные позволили предположить, что АДФ защищает АДФ-аминогидролазу от полной инактивации, предохраняя SH-группы активного центра фермента от блокирования тиоловыми реагентами. Из наших данных следует, что АМФ-аминогидролаза более чувствительна к действию тиоловых соединений и дисульфидов, чем АДФ-аминогидролаза, что можно объяснить наличием более реакционноспособных SH-групп в ферменте, вступающих в реакцию тиол-дисульфидного обмена. Проанализировав данные, полученные при исследовании влияния различных концентраций тиоловых реагентов на АМФ-аминогидролазную активность, мы предположили наличие двух типов SH-групп в ферменте.

При действии низких концентраций тиоловых реагентов: МК, ПХМБ в концентрации 10^{-4} М, Cd^{++} в концентрации 10^{-5} М, а также N-БСИ в концентрации 10^{-4} М связываются, по-видимому, поверхностные реакционноспособные SH-группы, что приводит к более активной конформации белковой молекулы, в результате чего АМФ-аминогидролазная активность возрастает.

Повышение концентрации тиоловых реагентов может привести к конформационным сдвигам, благодаря которым все большее число SH-групп становится подверженным их действию. Блокирование этих менее реактивных SH-групп приводит к инактивации АМФ-аминогидролазы. Однако нельзя исключить возможность неспецифического действия тиоловых ядов, применяемых в высоких концентрациях.

Аналогичные результаты были получены нами в отношении АМФ-аминогидролазной активности митохондриальной фракции мозга [5].

Следует отметить, что активность абсолютного большинства тиоловых ферментов под влиянием тиолсвязывающих реагентов резко подавляется.

Тем не менее описаны случаи, когда активность ферментов в присутствии тиоловых реагентов возрастает. Причиной этого является либо их диссоциация под влиянием тиоловых реагентов на более активные субъединицы [8, 10], либо избирательная модификация определенной части белковых SH-групп, как это было показано в отношении фруктозо-1,6-дифосфатазы [13, 15] и УДФ-глюкоронилтрансферазы [20]. N-ЭМ активизирует АМФ-аминогидролазу в любой из применяемых концентраций (10^{-4} — $5 \cdot 10^{-3}$ М), очевидно, за счет связывания SH-групп только первого типа. Не исключена возможность, что N-ЭМ не обладает способностью вызывать конформационные изменения в молекуле фермента и обнажать SH-группы второго типа, при связывании которых происходит падение ферментативной активности. Интересно, что в условиях наших опытов АМФ-аминогидролаза оказалась наиболее чувствительной к N-ЭМ среди всех испытанных нами тиолсвязывающих соединений, хотя наиболее специфическими тиоловыми реагентами являются органические

соединения ртути, и в частности ПХМБ. Возможно, это объясняется тем, что N-ЭМ, в отличие от других тиоловых реагентов, не связывается с SH-группами второго типа, либо он, реагируя с SH-группами, способен одновременно взаимодействовать с какими-либо другими, расположенными в непосредственной близости с ними функциональными группами белка, как это было показано в отношении ряда других ферментов [16, 17].

Данные, полученные в отношении действия тиоловых реагентов на АДФ-аминогидролазную активность, дают основание полагать, что АДФ-аминогидролаза относится к числу типичных тиоловых ферментов, так как при блокировании ими SH-групп активность фермента значительно падает.

Институт биохимии
АН АрмССР

Поступило 10.I 1973 г.

Յ. Մ. ՆԵՐՍԻՍՅԱՆ, Ա. Վ. ՀԱՐՈՒԹՅՈՒՆՅԱՆ

ԹԻՈՒԱՅԻՆ ՌԵԱԿԵՆՏՆԵՐԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ՈՒՂԵՂԱՅԻՆ ՀՅՈՒՍՎԱԾՔԻ
ԱՄՖ- ԵՎ ԱԴՖ-ԱՄԻՆԱՀԻԴՐՈՒԱԶԱՅԻՆ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՎՐԱ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Հոգիաժում ցույց է տրվում, որ սպիտակ առնետների ուղեղային հյուսվածքի լուծելի ֆրակցիայի ԱՄՖ-և ԱԴՖ-ամինահիդրոլազների կատալիտիկ հատկությունների միջև կա տարբերություն:

N-էթիլմալեիմիդ-ի (N-էՄ-ի), մալեինաթթվի (ՄԹ-ի), պարաքլորմեկուրիքենդոատ-ի (ՊԲՄԲ-ի), CdCl_2 -ի, N-բրոմսուկցինիմիդի (N-ԲՍԻ-ի) ցածր կոնցենտրացիաները ավելացնում են ԱՄՖ-ամինահիդրոլազի ակտիվությունը և չեն ազդում ԱԴՖ-ամինահիդրոլազի ակտիվության վրա:

ԱՄՖ-ի ամինահիդրոլազի ակտիվության մեծացումը թիոլ-կապող միացությունների ազդեցության տակ պայմանավորված է այն բանով, որ վերջիններս կապում են ֆերմենտի մակերեսային ռեակցիոնունակ SH-խմբերը: Ֆերմենտի արգելակումը տեղի է ունենում թիոլ-կապող միացությունների և թողարկված խմբերի փոխազդեցության դեպքում:

Թիոլ-կապող միացությունների արգելակող ազդեցությունը ԱԴՖ-ամինահիդրոլազի վրա հնարավորություն է տալիս ենթադրելու, որ ԱԴՖ-ամինահիդրոլազան տիպիկ թիոլային ֆերմենտ է և այն ինակտիվանում է, երբ նրա SH-խմբերը կապվում են:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Арутюнян А. В. и Погосян А. А., Тезисы II Всесоюзного биохимического съезда, Ташкент, 7, 10, 1969.
2. Арутюнян А. В. и Нерсисян Ц. М. Вопросы биохимии мозга. Изд. АН Арм. ССР, 6, 39, 1970.

3. Бунягян Г. Х. и Арутюнян А. В. Вопросы биохимии мозга. Изд. АН Арм. ССР, 4, 29, 1968.
4. Силакова А. И., Труш Г. П. и Явилякова А. Вопросы медицинской химии, 8, 538, 1962.
5. Buniatian H. Ch. and Haroutunian A. V. J. Neurochem. 18, 859, 1964.
6. Cerletti P., Buccl F. and Ipata D. Biol. Abstr., 35, 43686, 1960.
7. Deutsch A. and Nilsson R. Soc. Chem. Ind., 7, 1288, 1953.
8. Gerhart S. C. and Pardee A. D. J. Biol. Chem., 237, 891, 1962.
9. Haroutunian A. V. and Buniatian H. Ch., Abstracts of 6th FEBS. Meeting, Madrid, 667, 1969.
10. Kaufman B. T. J. Biol. Chem., 239, PC 669, 1964.
11. Lowry O. H., Rosebrough N. F. Farr A. L. and Randall R. T. J. Biol. Chem., 193, 225, 1951.
12. Lowry H. O. and Loper V. J. Biol. Chem., 162, 421, 1964.
13. Little C., Sanner T. and Pihl A. Eur. J. Biochem., 8, 229, 1968.
14. Peel J. L. and Lougehman B. C. Biochem J., 65, 709, 1957.
15. Pontremoli S., Traiclo S., Enser M., Shapiro S. and Horecker B. L. Proc. Nat. Acad. Sci, USA, 58, 286, 1968.
16. Smyth D. G., Nagamatsu A. and Trudon I. S. J. Amer. Chem. Soc., 82, 4600, 1960.
17. Smyth D. G., Blumenfeld O. O. and Kontgsberg W. Biochem J., 91, 589, 1964.
19. Spande T. F. and Witkop B. Methods in Enzymology, II, p. 528, 1967, N. Y., London Academ. Press.
19. Webster H. L. Nature 178, 4375, 453, 1953.
20. Zakim D. and Vessey D. A. Arch. Biochem. Biophys., 148, 97, 1972.