

К ВОПРОСУ О РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ, ОСУЩЕСТВЛЯЮЩИХ ДЕАМИНИРОВАНИЕ L-АМИНОКИСЛОТ В КОРКОВОМ СЛОЕ ПОЧЕК БЕЛЫХ КРЫС

А. С. ОГАНЕСЯН, Ж. С. ГЕВОРКЯН

Исследования показали, что фосфорилирование почечных белков приводит к повышению активности ферментов, осуществляющих деаминирование L-глутаминовой, L-аспарагиновой кислот и L-орнитина, а дефосфорилирование, наоборот, к понижению. Судя по полученным данным, активность аминокислотдеаминирующих ферментов регулируется путем фосфорилирования и дефосфорилирования.

Ключевые слова: деаминирование L-аминокислот, фосфорилирование и дефосфорилирование ферментов.

Процессы фосфорилирования и дефосфорилирования в живом организме представляют чрезвычайную важность, поскольку при их помощи активность многочисленных биологически активных белков, в том числе и ферментов, регулируется в соответствии с физиологическим состоянием организма.

Установлено, что фосфорилирование некоторых ферментов, как фосфорилаза *в*, киназа фосфорилазы *в*, щелочная фосфатаза, Na^+ - K^+ -активируемая АТФ-аза и других, приводит к повышению их активности, а фосфорилирование других, как гликогенсинтетаза, дегидрогеназа пировиноградной кислоты, карбоксилаза ацетил-СоА, наоборот, к снижению ее. При дефосфорилировании этих ферментов соответственно наблюдается обратное явление [4, 6, 8, 9]. В этих процессах важную роль играет циклический 3',5'-аденозинмонофосфат-зависимая протеинкиназа, при участии которой терминальный макроэргический фосфат АТФ переносится на те или иные белки, в том числе и на ферменты, что приводит к соответствующему изменению их активности. Фосфорилированный белок (фермент) подвергается дефосфорилированию под действием фосфопротеинфосфатазы, которая, как и протеинкиназа, локализована в области различных клеточных элементов (наружных мембран, цитоплазмы, митохондрии и др.) [5, 10].

Ранее нами было показано, что активность ферментов, осуществляющих деаминирование L-аминокислот в корковом слое почек, тесно связана с энергетическим состоянием этой ткани, т. е. при повышении содержания АТФ активность этих ферментов возрастает и, наоборот, при уменьшении его, она снижается. Мы предполагали, что изменение активности упомянутых ферментов в зависимости от содержания АТФ в

почечной ткани, возможно, связано с их фосфорилированием и дефосфорилированием [1—3]. В связи с этим было предпринято настоящее исследование.

Материал и методика. Белым крысам предварительно вводили $50 \mu\text{Ci } ^{32}\text{P}\text{---ATF}$ (специфическая активность— $19,5 \text{ mCi/mM}$) и через три часа забивали их, затем удаляли почки и в холодных условиях приготавливали срезы коркового слоя, которые инкубировали (по 100 мг) в Кребс-Рингер-бикарбонатном буфере при $t=37^\circ$, в течение одного часа, в атмосфере высокого (кислород 95%, углекислый газ—5%) и низкого (воздух) парциального давления кислорода. Изучали действие ряда факторов и условий инкубации на дефосфорилирование белков почечной ткани, определяли содержание ATF и активность ферментов, осуществляющих деаминирование некоторых L-аминокислот (глутаминовая, аспарагиновая, орнитин).

В зависимости от условий опыта к инкубируемым пробам были добавлены: 1. с целью усиления дефосфорилирования белков почечной ткани—щелочная фосфатаза (1 мг), экстракт коркового слоя почек (обладающий высокой фосфопротеинфосфатазной активностью), соответствующий 0,2 г сырой ткани; 2. с целью снижения содержания ATF в почечной ткани—dl-этионин (2,6 мг/мл), обнаруженный нами сывороточный ингибитор процессов деаминирования L-аминокислот, частично очищенный (1 мг), проведена также инкубация в атмосфере низкого парциального давления кислорода. После инкубации, путем центрифугирования, срезы отделяли от инкубационной среды, в которой затем определяли содержание радиоактивного фосфора и количество аммиака, образовавшегося из добавленных аминокислот, а в срезах определяли содержание ATF. Аминокислоты добавляли в количестве 16 мкМ на пробу. Аммиак определяли микродиффузионным методом по Конве, ATF—по UV тесту, с использованием набора соответствующих реактивов (Boehringer).

Результаты и обсуждение. Результаты исследований показали, что в контрольных опытах, проведенных в атмосфере высокого парциального давления кислорода, выявляется сравнительно небольшое количество радиоактивного фосфора (рис. 1 А). Под действием щелочной фосфатазы и экстракта почек содержание радиоактивного фосфора в инкубационной среде по сравнению с контрольным опытом значительно повышается, что указывает на усиление дефосфорилирования белков почек под действием этих ферментов. Интересно отметить, что подобное явление наблюдается и при инкубации срезов в атмосфере низкого парциального давления кислорода, под действием dl-этионина и, что особенно интересно, под влиянием сывороточного ингибитора.

Как видно из данных, приведенных на рис. 1 Б, срезы, инкубируемые в атмосфере высокого парциального давления кислорода, из глутаминовой, аспарагиновой кислот и из орнитина продуцируют значительное количество аммиака, между тем как в присутствии щелочной фосфатазы, экстракта почечной ткани, dl-этионина, сывороточного ингибитора, а также при инкубации в условиях низкого парциального давления кислорода наблюдается значительное подавление этого процесса.

Данные табл. 1 показывают, что при инкубации срезов почек в условиях низкого парциального давления кислорода, а также под действием dl-этионина и сывороточного ингибитора значительно снижается содержание ATF в почечной ткани, между тем как при инкубации срезов в условиях высокого парциального давления кислорода наблюдается

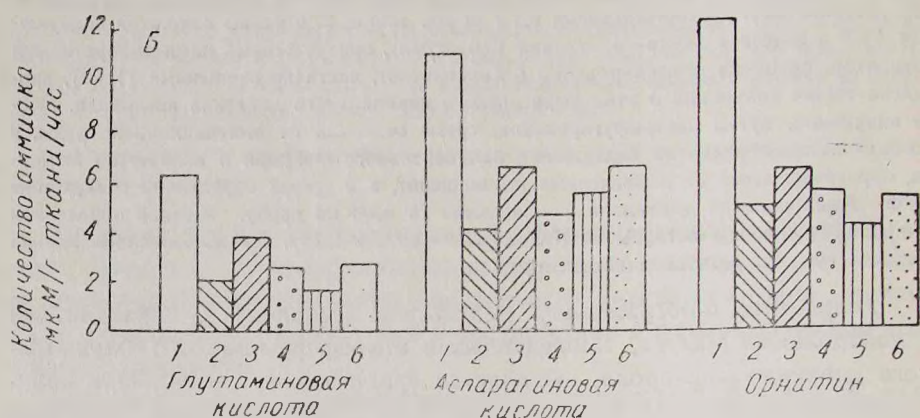
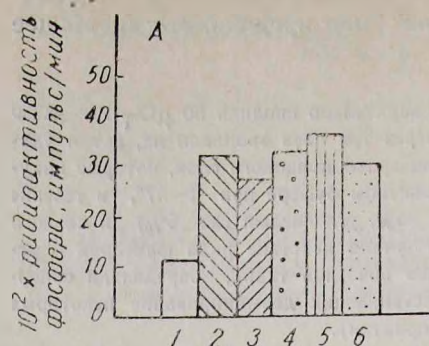


Рис. 1. Влияние различных факторов и условий инкубации на дефосфорилирование почечных белков (А) и образование аммиака из некоторых L-аминокислот (Б) в срезах коркового слоя почек. 1. Контроль—инкубация в атмосфере $O_2 + CO_2$; 2. инкубация в атмосфере воздуха; 3. инкубация в присутствии щелочной фосфатазы; 4. инкубация в присутствии сывороточного ингибитора; 5. инкубация в присутствии экстракта почек; 6. инкубация в присутствии dl-этионина.

Таблица
Изменение содержания АТФ в срезах коркового слоя почек белых крыс при инкубации их в различных условиях

Условия опыта	Содержание АТФ, мкМ/г ткани
Эндогенное количество	0,35
Инкубация в течение 60 мин в среде буфера в атмосфере $O_2 + CO_2$	0,47
Инкубация в течение 60 мин в среде буфера в атмосфере воздуха	0,1
Инкубация в течение 60 мин в среде буфера в присутствии сывороточного ингибитора	0,15
Инкубация в течение 60 мин в среде буфера в присутствии dl-этионина	0,15

заметное повышение содержания этого макроэргического фосфорного соединения по сравнению с исходным уровнем.

Приведенные данные показывают, что существует тесная связь между энергетическим состоянием почечной ткани и активностью ферментов, осуществляющих деаминирование ряда L-аминокислот. Условия, способствующие повышению содержания АТФ (инкубация срезов в атмосфере высокого парциального давления кислорода), приводят к повышению активности упомянутых ферментов и, наоборот, факторы, способствующие снижению содержания АТФ (инкубация срезов в атмосфере низкого парциального давления кислорода, а также действие dl-этионина), вызывают снижение их активности. Интересно отметить, что сывороточный ингибитор, который в физиологических условиях циркулирует в крови и находится во многих тканях, также вызывает снижение содержания АТФ и подавление активности аминокислотдеаминирующих ферментов в почечной ткани.

С другой стороны, при высоком содержании АТФ почечные белки, в том числе, по всей вероятности, и ферменты, осуществляющие деаминирование L-аминокислот, находятся в определенной степени фосфорилированном состоянии и обладают высокой каталитической активностью, между тем как дефосфорилирование белков (в том числе и упомянутых ферментов) при помощи щелочной фосфатазы и фосфопротеинфосфатазы приводит к снижению их активности. Ряд исследователей показали, что щелочная фосфатаза проявляет также и фосфопротеинфосфатазную активность [7. 11]. С другой стороны, как показывают настоящие исследования, инкубация срезов в условиях, способствующих снижению содержания АТФ, также сопровождается усилением дефосфорилирования почечных белков и подавлением активности вышеупомянутых ферментов. Особенно интересно, что подобное явление наблюдается также под действием сывороточного ингибитора. Наши другие исследования показали, что в результате усиления окислительных процессов содержание АТФ в почечной ткани повышается, связывание меченого фосфора с белками протекает более интенсивно, чем при низком содержании этого макроэргического соединения.

Таким образом, наблюдается тесная связь между фосфорилированием почечных белков и активностью аминокислотдеаминирующих ферментов. Полученные результаты дают основание полагать, что фосфорилирование этих ферментов приводит к повышению их активности, а дефосфорилирование, наоборот, к снижению. Нами было показано существование подобного механизма регуляции активности в отношении кристаллической глутаматдегидрогеназы. Мы не сомневаемся, что подобный механизм существует и в отношении ферментов, вовлекающихся в процессы деаминирования L-аспарагиновой кислоты и L-орнитина. Однако в связи с отсутствием чистых препаратов эти вопросы требуют дальнейших исследований. В физиологических условиях фосфорилирование и дефосфорилирование белков почек (в том числе и указанных ферментов) сбалансированы и поддерживаются на определенном уровне.

не, благодаря относительно постоянному содержанию АТФ, активности протеинкиназы и фосфопротенифосфатазы. Результаты наших исследований показывают, что при снижении содержания АТФ в почечной ткани превалируют процессы дефосфорилирования ферментов, осуществляющих деаминирование L-аминокислот, что приводит к торможению их активности, а в условиях, когда содержание АТФ в почечной ткани повышается, наблюдается усиление процессов фосфорилирования этих ферментов и возрастание их каталитической активности. В этом отношении большой интерес представляет действие сывороточного ингибитора, который является физиологическим соединением и принимает активное участие в метаболизме аминокислот. Полученные результаты показывают, что это соединение путем изменения содержания АТФ в почечной ткани оказывает регулирующее влияние на активность ферментов, осуществляющих деаминирование L-аминокислот. Ранее нами были получены данные, согласно которым в зависимости от физиологического состояния организма активность этого фактора в сыворотке крови изменяется (снижается при ацидозе) [1].

Каков механизм снижения содержания АТФ в почечной ткани под действием сывороточного ингибитора, пока трудно сказать. Надо полагать, что он действует на определенное звено окислительного фосфорилирования и подавляет эстерификацию неорганического фосфата. Наши опыты по изучению действия этого соединения на процессы окислительного фосфорилирования показали снижение отношения Р:О. Вопрос этот представляет большой интерес и будет служить предметом наших дальнейших исследований.

Институт биохимии АН Армянской ССР

Поступило 13.X 1980 г.

ԵՐԻԿԱՄՆԵՐԻ ԿԵՂՎԱՅԻՆ ՇԵՐՏՈՒՄ Լ-ԱՄԻՆԱԹՔՈՒՆԵՐԸ ԴԵԱՄԻՆԱՅԻՆՈՂ ՖԵՐՄԵՆՏՆԵՐԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ԿԱՐԳԱՎՈՐՄԱՆ ՀԱՐՅԻ ՇՈՒՐՋ

Ա. Ս. ՀՈՎՀԱՆՆԻՍՅԱՆ, Ժ. Ս. ԳԵՎՈՐԳՅԱՆ

Փորձերը ցույց են տվել, որ երբ սպիտակ առնետների երիկամների կեղևի կտրվածքներն ինկուբացիայի են ենթարկվում բուֆերային լուծույթում և թթվածնի բարձր պարցիալ ճնշման պայմաններում, նկատվում է մի շարք ամինաթթուների (գլյուտամինաթթու, ասպարագինաթթու, օրնիտին) դեամինացման պրոցեսների ուժեղացում և ադենոզինտրիֆոսֆատի (ԱՏՖ) քանակի բարձրացում: Ընդհակառակը՝ երբ երիկամների կտրվածքներն ինկուբացիայի են ենթարկվում ֆոսֆատազների (ալկալի ֆոսֆատազա, երիկամային հյուսվածքի էքստրակտ, որն ունի բարձր ֆոսֆոպրոտեին-ֆոսֆատազային ակտիվություն), ինչպես նաև այնպիսի ազդակների ներկայությամբ, որոնք նվազեցնում են երիկամային հյուսվածքի ԱՏՖ-ի քանակը (թթվածնի ցածր պարցիալ ճնշման պայմաններում կատարված ինկուբացիա, dI-էթիոնին, արյան շիճուկի ինհիբիտոր) նկատվում է այդ հյուսվածքի սպիտակուցների դեֆոս-

ֆորացման ուժեղացում և, իբրև հետևանք, վերոհիշյալ ամինաթթուների դեամինացման պրոցեսների արգելակում:

Ստացված տվյալները հիմք են տալիս եզրակացնելու, որ երիկամի կեղևային շերտում վերոհիշյալ ամինաթթուները դեամինացնող ֆերմենտների ակտիվությունը կարգավորվում է նրանց ֆոսֆորացմամբ և դեֆոսֆորացմամբ:

ON THE PROBLEM OF REGULATION OF ACTIVITY OF L-AMINOACIDS DEAMINATING ENZYMES IN RAT RENAL CORTEX

A. S. OHANESSIAN, J. S. GEVORKIAN

The activity of glutamic dehydrogenase, as well as the enzymes possessing deaminating activity of L-aspartic acid and L-ornithine in the renal cortex, is regulated by phosphorylation and dephosphorylation. Phosphorylation leads to elevation and dephosphorylation to reduction of activity of these enzymes. This regulation of enzyme activity is realized by means of protein substance in blood serum.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Геворкян Ж. С., Оганесян А. С. ДАН АрмССР, 61, 2, 104, 1975.
2. Геворкян Ж. С., Оганесян А. С. ДАН АрмССР, 66, 1, 52, 1978.
3. Лайта А., Шварц М., Сершен Г., Геворкян Ж. С., Оганесян А. С. ДАН АрмССР, 68, 1, 50, 1979.
4. Carney J. T., Beynon R. J., Kay J. a. Birket N. Biochem J., 175, 105, 1978.
5. Carlsen S. A., Till J. E., Ling V. Biochem. Biophys. Acta, 467, 238, 1977.
6. Huang K. R. a. Huang F. L. Biochem. Biophys. Res. Commun., 92, 682, 1980.
7. Huang K. R., Robinson J. Y. a. Chou J. Y. Biochem. Biophys. Res. Commun, 70, 186, 1976.
8. Krakauer G. R. a. Kim K. H. Biochem. Biophys. Res. Commun., 92, 389, 1980.
9. Lee K. H., Kim K. H. J. Biol. Chem., 252, 1748, 1977.
10. Makan N. R. Biochem. Biophys. Acta, 585, 360, 1979.
11. Mellgren R. L., Slaughter G. R., Thomas J. A. J. Biol. Chem., 252, 6082, 1977.