

However joint addition of phosphate cytrate, succinate, -ketoglutarate and aspartate dont lead to intensification of stimulatory effect of these activators.

Thyroid hormones and their derivatives play important role in the regulation of renal glutaminase.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Бадалян Л. Л., Оганесян В. С. Биолог. ж. Армении, 35, 29, 1982.
2. Оганесян В. С. Докл. АН Армянской ССР, 48, 171, 1969.
3. Оганесян В. С., Амбарцумян В. Г. Биолог. ж. Армении, 32, 477, 1979.
4. Оганесян В. С., Бадалян Л. Л., Микиртумова К. С., Саакян Ж. Дж. Вопросы биохимии мозга, 8, 77, Ереван, 1973.
5. Оганесян В. С., Бунятян Г. Х., Микиртумова К. С., Бадалян Л. Л. Вопросы биохимии мозга, 5, 5, Ереван, 1969.
6. Оганесян В. С., Бунятян Г. Х., Микиртумова К. С., Бадалян Л. Л. Вопросы биохимии мозга, 6, 5, Ереван, 1970.
7. Оганесян В. С., Микиртумова К. С., Бунятян Г. Х. Вопросы биохимии мозга, 12, 5, Ереван, 1977.
8. Оганесян В. С., Саакян Ж. Дж., Айрапетян Р. Л., Бунятян Г. Х. Биолог. ж. Армении, 9, 932, 1980.
9. Силакова А. И., Труш Г. П., Являева А. Вопросы мед. химии, 8, 538, 1962.
10. Katunuma N., Katsunuma T., Tomino J. and Matsuda J. Adv. Enzyme Reg., 6, 227, 1968.
11. Kvamme E., Torgner J. Aa. FEBS Letters, 47, 244, 1974.
12. Kvamme E., Torgner J. Aa. Biochem. J., 149, 83, 1975.
13. Kvamme E., Torgner J. Aa. Biochem. J., 137, 525, 1974.
14. Svenneby S., Tveit B. and Kvamme E. J, Biol. Chem., 245, 1871, 1970.
15. Weil-Malherbe H. J. Neurochem., 19, 2257, 1972.
16. Weil-Malherbe H. J. Neurochem., 16, 855, 1969.
17. Weil-Malherbe H. and Beall I. D. J. Neurochem., 17, 1101, 1970.

«Биолог. ж. Армении», т. XXXV, № 4, 1982

УДК 577.158.347

КОНФОРМАЦИОННАЯ СТАБИЛЬНОСТЬ ГЛУТАМАТДЕГИДРОГЕНАЗ ИЗ МОЗГА И ПЕЧЕНИ

Р. А. КАЗАРЯН, А. А. ПОГОСЯН, Қ. А. МАРТИРОСЯН, Л. В. КАРАБАШЯН

Методом изотермической денатурации мочевиной изучена конформационная устойчивость глутаматдегидрогеназ из печени и мозга крыс и крупного рогатого скота. Показано, что ферменты из печени и мозга крупного рогатого скота более устойчивы к денатурирующему воздействию мочевины по сравнению с таковыми крыс. Вместе с тем, ферменты одного и того же животного не различаются по конформационной устойчивости.

Ключевые слова: глутаматдегидрогеназа, конформация.

В настоящее время установлено, что глутаматдегидрогеназы из органов разных млекопитающих отличаются друг от друга рядом физико-химических и каталитических свойств. Известно, что каталитически ак-

тивные гексамеры глутаматдегидрогеназы из печени крупного рогатого скота способны линейно полимеризоваться [4, 5], однако фермент из печени крыс такой способностью не обладает [3]. В последнее время было установлено, что каталитические свойства глутаматдегидрогеназ из мозга и печени крыс и крупного рогатого скота несколько различаются. Можно предполагать, что зависимость свойств глутаматдегидрогеназы от источника может быть обусловлена конформационными особенностями фермента, которые проявляются как на уровне каталитически активного гексамера в целом, так и на уровне локальных различий в активных центрах.

Настоящее сообщение посвящено изучению конформационной стабильности глутаматдегидрогеназ из мозга и печени крыс и крупного рогатого скота.

Материал и методика. Использовали кристаллическую глутаматдегидрогеназу из печени крупного рогатого скота (производства «Флука», Швейцария), суспендированную в 2 М сульфате аммония. Фермент очищали от избытка соли центрифугированием с последующей хроматографией на колонке 1×15 см с сефадексом Г-25.

Очистку глутаматдегидрогеназы из печени крыс, включая стадию ионообменной хроматографии на ДЕАЕ сефадексе А-50, проводили по Арнольду и Мейеру [3]. Фракцию, содержащую фермент, ставили на диализ против 0,16 М NaCl в 0,05 М калий-фосфатном буфере, pH 7,4 и подвергали повторной хроматографии на колонке 3×50 см ДЕАЕ сефадекса А-50, элюируя его 0,18 М NaCl в 0,05 М калий-фосфатном буфере, pH 7,4. Затем фракцию, обладающую ферментативной активностью, гущали на ультрафильтре «Диафло» ИМ-30 в аппарате «АМПКОН» до 10 мл и подвергали гельфильтрации на колонке 2×100 см Г-200, элюируя 0,1 М калий-фосфатным буфером, pH 7,4. Полученный образец был очищен примерно в 180 раз и обладал удельной активностью 115 ед/мг белка.

Глутаматдегидрогеназу из мозга крупного рогатого скота и крыс получали по методам, описанным ранее [1, 6].

Активность ферментов определяли спектрофотометрически по изменению экстинкции кофермента при 340 нм в реакции восстановительного аминирования α -кетоглутарата. Концентрации реагентов в реакционной смеси были следующими (М): 10^{-4} НАДН, 5×10^{-3} α -кетоглутарата и 5×10^{-4} NH_4Cl . Активность измеряли в кювете длиной оптического пути 1 см, содержащей 1,5 мл реакционной смеси в 0,1 М калий-фосфатном буфере, pH 7,8. Реакцию инициировали добавлением фермента. Все реагенты, использованные в работе, были химически чистыми.

Конформационную устойчивость глутаматдегидрогеназ оценивали, используя метод изотермической денатурации белков под действием мочевины. Ферменты инкубировали в 0,1 М калий-фосфатном буфере, pH 7,4, содержащем различные концентрации мочевины (от 0 до 6 М), в течение 6 ч при 25°. В качестве показателя степени денатурации использовали параметр A_M/A_0 , где A_M и A_0 активности глутаматдегидрогеназ, инкубированных при наличии мочевины и без нее. За равновесием реакции денатурации следили по выходу на постоянный уровень остаточной активности ферментов. Использование данного параметра для оценки степени денатурации фермента правомерно в том случае, если активность падает в результате денатурации, а не из-за локальных конформационных изменений, влияющих на активность, но не затрагивающих вторичную и третичную структуры белка в целом. Сравнение изотермы денатурации глутаматдегидрогеназы из органов крупного рогатого скота, полученной данным методом, с аналогичной изотермой, полученной ранее [2] измерением кругового дихроизма в области поглощения пептидных связей (223 нм), свидетельствует о возможности применения параметра A_M/A_0 для оценки степени денатурации, поскольку обе изотермы практически совпадают (рис).

Применение параметра A_M/A_0 имеет то преимущество, что для оценки степени денатурации требуются каталитические количества глутаматдегидрогеназы и нет необходимости в использовании гомогенных препаратов фермента.

Результаты и обсуждение. На рис. представлены изотермы денатурации глутаматдегидрогеназы из печени и мозга крупного рогатого скота. Из рисунка видно, что денатурация мочевиной носит кооперативный характер и оба фермента характеризуются одним и тем же значением точки-полуденатурации C_0 , соответствующем 3,2 М мочевины. Кон-

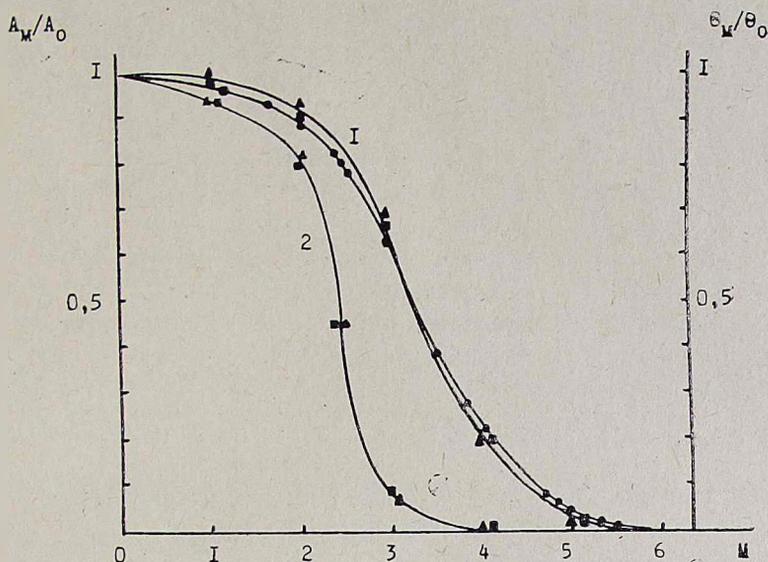


Рис. Изотермы денатурации глутаматдегидрогеназ 1—из мозга (■) и печени (▲) крупного рогатого скота; 2—из мозга (■) и печени (▲) крыс; (●)—изотерма денатурации глутаматдегидрогеназы из печени крупного рогатого скота, полученная методом КД.

формационная устойчивость глутаматдегидрогеназ из мозга и таковая из печени крыс также не отличаются друг от друга. Однако точка их полуденатурации составляет 2,4 М, что значительно ниже по сравнению с глутаматдегидрогеназами из тех же органов крупного рогатого скота. Этот факт свидетельствует о различии в конформационных состояниях и устойчивости этих ферментов из органов крупного рогатого скота и крыс. Поскольку каталитически активные гексамеры фермента из печени крупного рогатого скота в отличие от фермента из печени крыс способны к самоассоциации в линейные полимеры [3—5], можно полагать, что высокая конформационная устойчивость первых обусловлена взаимодействием гексамеров. Для выяснения этого вопроса была изучена концентрационная зависимость параметра C_0 глутаматдегидрогеназы из печени крупного рогатого скота при концентрациях 0,05, 0,2 и 1 мг/мл. Согласно данным Гаупера и соавт. [5], фермент полимеризуется начиная с концентрации 0,1 мг/мл, а при концентрации 1 мг/мл его средняя молекулярная масса составляет около 1 000 000. Проведенные исследования показали, что значение параметра C_0 практически не зависит от концентрации фермента. Следовательно, различия в конформационной устойчивости глутаматдегидрогеназ из органов крупного рогатого скота и крыс обусловлены внутримолекулярными взаимодействиями каталитически активных гексамеров ферментов. Вместе с тем, сог-

ласно кинетическим данным [1], глутаматдегидрогеназа из мозга крупного рогатого скота характеризуется лучшим сродством к глутамату и α -кетоглутарату в присутствии НАД, чем фермент из печени. Значение константы Михаэлиса глутамата для ферментов из мозга крыс по сравнению с таковым из печени примерно в 5 раз выше. Кроме того, глутаматдегидрогеназа из мозга крыс в отличие от фермента из печени полностью инактивируется в присутствии НАДФ в течение 30 мин при комнатной температуре [6].

Совпадение параметров S_0 глутаматдегидрогеназ из мозга и печени, несмотря на различие некоторых их свойств, свидетельствует об идентичности конформационных состояний каталитически активных гексамеров этих ферментов в целом.

Учитывая это обстоятельство, можно полагать, что отмеченные различия в свойствах глутаматдегидрогеназ из мозга и печени являются следствием разного характера взаимодействия с коферментами и субстратами и обусловлены локальными структурными различиями в области активных центров.

Институт биохимии АН Армянской ССР

Поступило 22.V 1981 г.

ՈՒՂԵՂԻ ԵՎ ԼՅԱՐԳԻ ԳԼՈՒՏԱՄԱՏԳԵԶԻԴՐՈԳԵՆԱԶԱՅԻ ԿՈՆՖՈՐՄԱՑԻՈՆ ԿԱՅՈՒՆՈՒԹՅՈՒՆԸ

Ռ. Ա. ԿԱԶԱՐՅԱՆ, Ա. Ա. ՊՈԳՈՍՅԱՆ, Կ. Ա. ՄԱՐՏԻՐՈՍՅԱՆ, Լ. Վ. ԿԱՐԱՄԱՇՅԱՆ

Իզոթերմիկ դենատուրացիայի մեթոդով (միզանյուլթի օգնությամբ) ուսումնասիրվել է առնետների և խոշոր եղջերավոր անասունների ուղեղի ու լյարդի գլուտամատդեհիդրոգենազայի կոնֆորմացիոն կայունությունը: Ցույց է տրվել, որ խոշոր եղջերավոր անասունների ուղեղի և լյարդի գլուտամատդեհիդրոգենազները կայուն են միզանյուլթով առաջացվող դենատուրացիայի նկատմամբ: Դրա հետ մեկտեղ, նույն կենդանու ուղեղի և լյարդի ֆերմենտներն իրենց կոնֆորմացիոն կայունությամբ չեն տարբերվում:

CONFORMATIONAL STABILITY OF GLUTAMATE DEHYDROGENASE FROM BRAIN AND LIVER

R. A. KAZARYAN, A. A. POGOSYAN, K. A. MARTIROSYAN,
L. V. KARABASHIAN

Conformational stability of glutamate dehydrogenase (L-glutamate NAD (P) oxidoreductase, E. C. 1.4.1.3) from rat and cattle liver and brain was investigated using urea isothermic denaturation method. Glutamate dehydrogenase from cattle liver and brain are more stable to urea denaturation than the enzymes from rat tissues. At the same time the enzymes from two tissues of the same animal are not distinguished by their conformational stability.

ЛИТЕРАТУРА

1. Карабашян Л. В., Агаджанян С. А., Сафарян В. М., Мовсесян С. Г. Биохимия, 45, 258—265, 1980.
2. Карабашян Л. В., Экизян Н. Г., Сафарян В. М., Мовсесян С. Г. Молекулярная биология, 14, 773—778, 1980.
3. Arnold H., Maier K. P. Biochim. et Biophys. Acta, 251, 133—140, 1971.
4. Gauper F. P., Markau K., Sund H. Eur. J. Biochem., 49, 555—563, 1974.
5. Olson J. A., Anfinsen C. B. J. Biol. Chem., 197, 67—79, 1952.
6. Po-Yok Chee, Dahl J. I., and Fahien L. A. J. of Neurochem., 33, 53—60, 1979.

«Биолог. ж. Армении», т. XXXV, № 4, 1982

УДК 577.152.547.963.2

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НЕКОТОРЫХ ПОЛИФОСФАТАЗ В МОЗГЕ БЕЛЫХ КРЫС

И. Г. АСЛАНЯН, Г. Т. АДУНЦ, А. А. ГАСПАРЯН

В сравнительном аспекте изучалась активность тримета-, тетрамета-, триполи-, пепли (субстрат $p=40$ и $p=308$) фосфатаз, а также кислой фосфатазы в мозге крыс под действием различных эффекторов, а также локализация, оптимум рН, термоустойчивость и стабильность этих ферментов. Предполагается, что неорганические полифосфатазы являются индивидуальными ферментами, играющими определенную роль в фосфорном и энергетическом обмене живых организмов.

Ключевые слова: полифосфатазы, чувствительность к эффекторам.

Неорганические полифосфаты в настоящее время выявлены у большинства низших и высших животных и растений, хотя у различных групп организмов их присутствие определено с разной степенью достоверности. Имеется много данных о превращениях неорганических полифосфатов в клетках живых организмов. Однако физиологическая роль этих фосфорных соединений до сих пор недостаточно ясна. Не исключено, что полифосфаты выполняют в жизнедеятельности организмов важные функции.

Изучение энзиматических реакций, осуществляющих превращения конденсированных неорганических полифосфатов, представляет несомненный интерес. Существует целый спектр ферментов, участвующих в обмене полифосфатов. Наличие разных путей распада внутриклеточных соединений, а следовательно, и разных ферментов, участвующих в этих процессах, позволяет более тонко регулировать скорость их течения в клетке, точно координируя ее со скоростью других, сопряженных с ним процессов. В этом отношении представляло несомненный интерес исследование в сравнительном аспекте свойств некоторых из ферментов обмена неорганических полифосфатов