Հայաստանի Գիտությունների Ազգային Ակադեմիա, Հայաստանի կենսաբանական Հանդես
Национальная Академия Наук Армении. Биологический Журнал Армении
National Academy of Sciences of Armenia, Biological Journal of Armenia

*Օրիգինալ հոդվածներ • Оригинальные статьи • Original articles*

Биолог. журн. Армении, 2 (52), 1999

УДК 636:393.577.1

# УЧАСТИЕ БЕЛКОВ В РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ГЛУТАМИНАЗЫ МОЗГА

**В.С. ОГАНЕСЯН, Е.Р. МИКАЕЛЯН, Л.Л. БАДАЛЯН, Ж.ДЖ. СААКЯН, А.Г. ВАРДАНЯН, Р.Г. КАМАЛЯН**

*Институт биохимии им. Г.Х. Бунятяна НАН Армении, 375014, Ереван*

Изучено влияние нативных и подвергнутых тепловой обработке белков различной природы на регуляторные свойства фосфатактивируемой глутаминазы (ФАГ) митохондрий мозга крысы. Показано, что нативный бычий сывороточный альбумин проявляет защитный эффект от активации фермента трийодо-L-тиронином ($T_3$), в отсутствие же последнего белок не влияет на эффективность анионных активаторов. Повышение концентрации $T_3$ не снимает, но заметно ослабляет защитный эффект альбумина, который еще менее выражен на фоне повышения концентрации $T_3$ и фосфата, а при определенном сочетании последних он полностью снимается. Термообработка приводит к незначительному изменению действия белков на ФАГ. Сделан вывод о возможном модифицирующем влиянии белкового микроокружения на регуляторные свойства митохондриальной ФАГ.

Ուսումնասիրվել է նատիվ և ջերմամշակման ենթարկված տարբեր բնույթի սպիտակուցների ազդեցությունը առնետի ուղեղի միտոքոնդրիումների ֆոսֆատով ակտիվացվող գլուտամինազայի (ՖԱԳ) կարգավորիչ հատկությունների վրա: Ցույց է տրվել, որ ցուլի շիճուկի նատիվ ալբումինը պաշտպանում է ֆերմենտը 3-յոդ-L-թիրոնինի ակտիվացնող ազդեցությունից, որի բացակայության դեպքում ալբումինը չի ազդում անիոնային ակտիվատորների էֆեկտիվության վրա: 3-յոդ-L-թիրոնինի բարձր քանակները չեն հանում, այլ նկատելիորեն թուլացնում են ալբումինի պաշտպանիչ ազդեցությունը, որը առավել թույլ է արտահայտվում 3-յոդ-L-թիրոնինի և ֆոսֆատի բարձր քանակների դեպքում, իսկ վերջիններիս որոշակի հանդրության դեպքում լիովին վերանում է: Ջերմամշակումը էական փոփոխություններ չի առաջացնում ՖԱԳ-ի նկատմամբ սպիտակուցների ունեցած ազդեցության մեջ: Ստացված տվյալները վկայում են միտոքոնդրիալ ՖԱԳ-ի կարգավորիչ հատկությունների վրա սպիտակուցների հնարավոր ձևափոխող ազդեցության մասին:

The influence of different native and heat treated proteins on activity of the phosphate activated glutaminase (PAG) from rat brain mitochondria has been studied. The bovine serum native albumin protects PAG from activation by the triiodo-L-thyronine ($T_3$). At the same time the albumin doesn't affect on anionic effectors during absence of $T_3$. The increase of $T_3$ concentrations considerably reduces the protective effect of albumin, which is less at high concentrations of $T_3$ and phosphate and is fully abilished during their definite combinations. The heat treatment causes insignificant modifications of proteins effect on PAG activity. The possible influence of the protein modification effect on regulatory properties of the mitochondrial PAG has been proposed.

*Митохондрии - глутамин - глутаминаза - белки*

В связи с приписываемой глутаминазе мозга роли поставщика медиаторов глутамата и ГАМК (4, 6, 10) интерес к ней не ослабевает. Он поддерживается также наличием множественной регуляции этого фермента, присутствием форм с разной клеточной локализацией, отличающихся физико-химическими, кинетическими и регуляторными свойствами, а также, скорее всего, и ролью в функционировании клетки.

Поскольку активация фосфатом связывается с ассоциацией субъединиц фермента [5, 7, 9] и предполагается, что наибольшая активность проявляется полиассоциированным белковым конгломератом, не исключается и наличие белок-белкового взаимодействия в качестве регуляторного фактора. Это выглядит достаточно правдоподобно и в свете взаимодействия фосфата с рядом факторов различной природы (ионы, нуклеотиды, гормоны, переносчики электронов и др.) в процессе регуляции ферментативной активности.

Исходя из вышеизложенного, мы попытались рассмотреть возможность участия различных белков (бычий сывороточный альбумин, g-глобулин, печеночная алкогольдегидрогеназа лошади и бычья панкреатическая рибонуклеаза) в процессе кооперативной регуляции растворимой формы глутаминазы из митохондрий мозга крысы.

***Материал и методика.*** В опытах использовали беспородных крыс массой 150-200 г. Митохондриальную фракцию получали из коры мозга по Палладину и Кирсенко [2]. Процедура выделения растворимой ФАГ описана ранее [1]. Полученный препарат фермента, содержащий 0.2-0.3 мг белка, инкубировали в 0.06 М Трис-HCl буфере (pH 8.0) с 20 мМ глутамина и различными концентрациями анионных активаторов (фосфат и цитрат), $T_3$ и испытуемых белков в общем объеме в 1.5 мл. pH всех использованных добавок доводили до 8.0 0.01 М раствором NaOH. Реакционную смесь инкубировали в течение 30 мин при 37° и постоянном встряхивании. Реакцию запускали добавлением глутамина, останавливали внесением в среду 0.3 мл 10% ТХУ. Продукт реакции - аммиак - определяли микродиффузионным методом [3], белок - по методу Лоури и др. [8] Активность фермента выражали в мкмоль $NH_3$/мг белка/мин. Использовали реактивы фирм "Sigma Chemical Company" (США) и "Reanal" (Венгрия). Полученные результаты подвергнуты статистической обработке с использованием критерия Стьюдента.

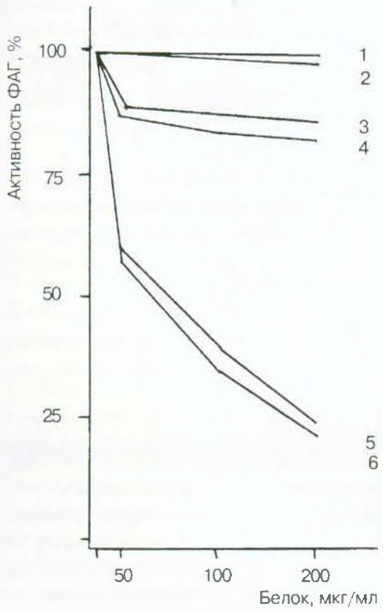


**Рис. 1.** Действие белков на активность ФАГ в присутствии эффекторов фермента, n=10-12: 1 - 10 мМ P+50 мМ цитрата+g-глобулин; 2 - 20 мМ P+50 мМ цитрата+g-глобулин; 3 - 50 мМ цитрата+0.05 мМ $T_3$+g-глобулин; 4 - 10 мМ P+0.05 мМ $T_3$+g-глобулин; 5 - 50 мМ цитрата+0.05 мМ $T_3$+альбумин; 6 - 10 мМ P+ 0.05 мМ $T_3$+альбумин

***Результаты и обсуждение.*** В первой серии опытов изучали влияние альбумина и глобулина на активность растворимой ФАГ в присутствии различных пар эффекторов, совместное применение которых значительно активирует фермент.

Данные, представленные на рис. 1, показывают, что степень ингибирования активности ФАГ зависит как от природы используемого белка, так и от комбинации эффекторов. Так, при одновременном применении 20 мМ фосфата и 50 мМ цитрата фермент индиферентен к белковым добавкам независимо от их концентрации. Вместе с тем при сочетании анионных активаторов с $T_3$ глобулин в концентрации 0.2 мг/мл ингибирует активность ФАГ на 18%. Добавление альбумина к инкубационной среде уже в концентрации 0.05 мг/мл вызывает подавление активности фермента на 40-45%. Повышение концентрации альбумина приводит к усилению ингибирования до 75-80% при сочетании $T_3$ как с фосфатом, так и с цитратом.

Учитывая возможность подавления ФАГ альбумином в результате связывания им $T_3$, в следующей серии опытов мы исследовали влияние альбумина на активность фермента при варьировании концентрации гормона с постоянной концентрацией фосфата ( 10 мМ ).

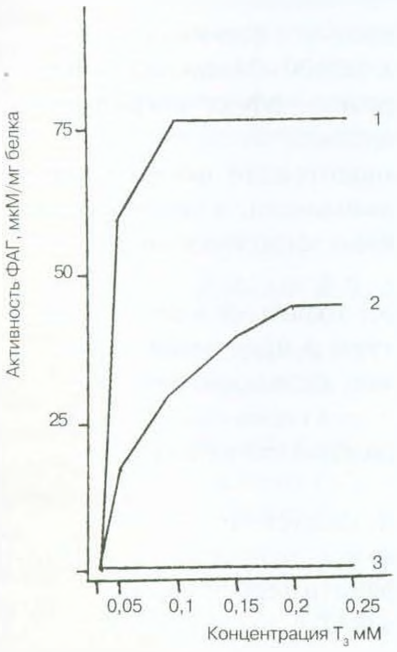


**Рис. 2.** Влияние концентрации $T_3$ на активность ФАГ и ингибирующий эффект альбумина: 1 - 10 мМ Р; 2 - 10 мМ Р+150 мкг/мл альбумина; 3 - контроль.

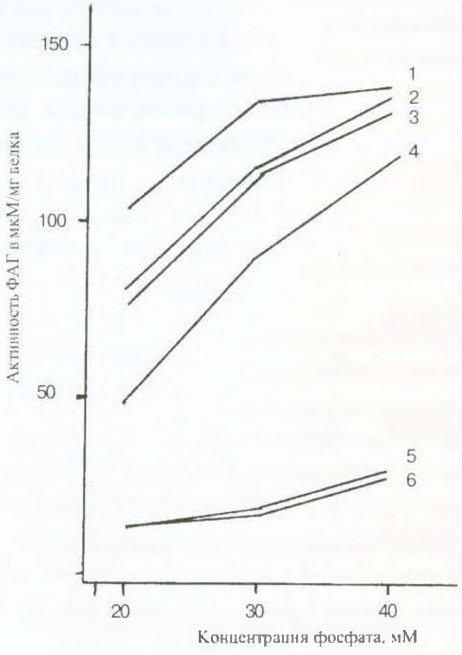


**Рис.3.** Влияние концентрации фосфата на ФАГингибирующую активность альбумина:1 - 0.03 мМ $T_3$; 2 - 0.02 мМ $T_3$; 3 - 0.03 мМ $T_3$+альбумин; 4 - 0.02 мМ $T_3$+альбумин; 5 - контроль; 6 - альбумин.

Из данных рис. 2 видно, что активность фермента выходит на плато при концентрации гормона 0.1 мМ. В присутствии альбумина понижается степень активации ФАГ гормоном, т.е. уменьшается сродство гормона к ферменту. Выход на плато активности фиксируется уже при концентрации гормона 0.20-0.25 мМ. Эти данные исключают возможность ингибирования активности ФАГ альбумином путем связывания молекул гормона, так как

увеличение концентрации последнего, хотя и ослабляет эффект альбумина, но полностью его не снимает. Кроме того, в присутствии альбумина сохраняется и нижний концентрационный предел активации гормоном (0.05 мМ).

Поскольку с повышением концентрации $T_3$ степень ингибирования активности фермента уменьшается, в следующей серии опытов влияние альбумина прослеживалось на фоне сочетания низких концентраций $T_3$ с относительно высокими концентрациями фосфата.

Полученные данные (рис. 3) показывают, что в условиях отсутствия альбумина наблюдается значительное возрастание активности фермента при сочетанном применении 0.02 мМ $T_3$ с различными концентрациями фосфата, степень которого, однако, снижается с повышением концентрации последнего. Так, при добавлении 0.02 мМ гормона активность ФАГ, стимулируемая 20 мМ фосфата, подавляется в присутствии альбумина примерно на 38%, а с повышением концентрации фосфата до 30 и 40 мМ степень ингибирования падает до 23 и 13% соответственно. В опытах с добавками 0.03 мМ гормона степень ингибирования фермента альбумином еще более понижается; при концентрации фосфата 20 мМ она составляет 26%, 30 мМ - 10%, а при 40%-ной концентрации эффект ингибирования активности глутаминазы почти полностью исчезает.

Таким образом, с повышением концентрации фосфата степень ингибирования ФАГ альбумином предельно уменьшается, и при определенном сочетании концентраций совместно применяемых эффекторов ингибирование может и не проявиться.

Приведенные выше результаты оставляют открытыми вопросы о способе действия альбумина, значении его структуры в проявлении эффекта и возможности участия других белков в регуляции активности фермента.

Для освещения этих вопросов в следующей серии опытов мы изучали влияние термообработки белков на их взаимодействие с растворимой ФАГ коры мозга.

Из данных, представленных в табл. 1, следует что у исследованных нами белков различной природы обнаруживаются сходные эффекты. И АДГ, и альбумин, и РНКаза снижают уровень активности фермента при сочетаниях фосфата с $T_3$ и не действуют на активность ФАГ в присутствии фосфата и сочетании его с цитратом.

Вместе с тем при термообработке белков их ингибирующая активность меняется. Если в присутствии нативной АДГ активность ФАГ, стимулируемая фосфатом+$T_3$, ингибируется на 39%, то при наличии термообработанного белка этот эффект достигает 54%. В опытах с альбумином наблюдается обратная картина, т.е. термообработанный альбумин ингибирует слабее нативного. Процент ингибирования снижается с 55 до 40. В то же время термообработка РНКазы совершенно не влияет на ее взаимоотношение с ферментом. Активность последнего в обоих случаях подавляется на 20%. Не меняется их отношение к ФАГ и при сочетанном применении активирующих анионов.

Таблица 1. **Влияние термообработанных белков на активность митохондриальной ФАГ мозга крысы (мкмоль $NH_3$/мг$^{-1}$ белка)**

| Условия опыта | Р10 мМ + $T_3$ 0.05 мМ | Р 20 мМ + Ц 50 мМ | Р 20 мМ |
|---|---|---|---|
| Контроль | 71±6.8 | 19±0.9 | 12±0.8 |
| Альбумин 0.1 мг/мл | 32±2.2 * | 17±2.2 | 12±0.9 |
| Альбумин 0.1 мг/мл термообработка | 43±5.1 * | 17±2.1 | 12±0.7 |
| АДГ 0.2 мг/мл | 44±3.4 * | 17±1.1 | 12±0.6 |
| АДГ 0.2 мг/мл термообработка | 33±4.2 * | 16±2.0 | 11±1.2 |
| РНКаза 0.3 мг/мл | 57±6.3 | 16±2.1 | 11±0.9 |
| РНКаза 0.3 мг/мл термообработка | 56±5.8 | 17±2.4 | 11±1.1 |

**Примечание*: $p<0.05$. Р - фосфат, Ц - цитрат.

Полученные результаты говорят об ограниченной роли белок-белковых взаимодействий в регуляции гидролиза глутамина. Тем не менее они свидетельствуют о значении природы и структуры белков, контактирующих с ФАГ и ее низкомолекулярными активаторами, в проявлении ферментативной активности.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Оганесян В.С., Бадалян Л.Л., Беджанян К.Д.* Нейрохимия, *7*, 4, 558-565, 1988.
2. *Палладин А.В., Кирсенко О.Б.* Биохимия, *26*, 2, 385-390, 1961.
3. *Силакова А.И., Труш Г.П., Явилякова Л.А.* Вопр. мед. хим., *8*, 5, 538-542, 1962.
4. *Bradford H.F., Ward H.K., Thomas A.J.* J. Neurochem., *30*, 1453-1459, 1978.
5. *Godfry S., Kuhlenschmidt T, Curtoys N.P.* J.Biol. Chem., *252*, 1927-1931, 1977.
6. *Hamberger A.G., Chiang G.H., Nylen E.S., et al.* Brain Res., *168*, 513-530, 1988.
7. *Kvamme E.* In: Glutamine Metabolism in Mammalian Tissues (Ed. H. Sies and D.Haussinger), 32-47, 1984.
8. *Lowry O.H., Rosebrough N.T., Farr A.L. et al.* J. Biol. Chem., *193*, 265-270, 1951.
9. *Nimmo G.A., Tipton K.F.* Eur. J. Biochem., *11*, 57-64, 1981.
10. *Reubi J.C., Van den Berg C.J., Cuenod M.* Neurosci. Lett., *10*, 171-174, 1978.

*Поступила 18.VII.1997*