

Биолог. журн. Армении, 1-2 (57), 2005

УДК 577.1.05

РЕГУЛЯЦИЯ ИЗОФЕРМЕНТОВ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ГЛУТАМИНАЗЫ АЭРОБНЫХ ИНФУЗОРИЙ *PARAMECIUM* *MULTIMICRONUCLEATUM*

С.А. КАРАПЕТЯН, А.А. ТАМРАЗЯН, Л.А. ПЕТРОСЯН, М.А. ДАВТЯН

Ереванский государственный университет, кафедра биохимии, 375025

The mitochondrial glutaminase of *Paramecium multimicronucleatum* have been partial purified by the method of the ionexchange. It has been shown, that more than 80% of total glutaminase activity of *P. multimicronucleatum* is located in the mitochondrias of the cells. Two isoenzymes of the glutaminase have been revealed in the mitochondrias of *P. multimicronucleatum*. The glutaminase I is phosphate dependent, while glutaminase II is phosphate independent, it is positively regulated by citrate. ATF, thyroxine, dexamethasone, adrenaline and bicarbonate have show the positive effect on activation of both mitochondrial isoglutaminases.

Глутаминаза - изоэнзимы - простейшие

Глутамин, являясь протеиногенной аминокислотой, входит в состав всех белков. В метаболизме клеток он занимает нейтральное место и, синтезируясь из свободного аммиака и глутамата, участвует в процессе нейтрализации аммиака. Одновременно глутамин является транспортной формой аммиака, так как переносит последний с места нейтрализации к органам выделения его (жабры, почки, поверхностные клетки) или к осуществляющей биосинтез мочевины печени, где под действием глутаминазы расщепляется на глутамат и свободный аммиак. Глутамин является также активной формой аммиака, так как последний, предварительно превращаясь в амидный азот глутамина, может вовлекаться в биосинтез ряда биологически важнейших соединений (пуриновые и пиримидиновые нуклеотиды, гексозамины и др.). Катаболизм глутамина прокариотических и эукариотических организмов осуществляется глутаминазой [5, 14]. Исследования последней показали, что существуют по крайней мере два изофермента глутаминазы: фосфатзависимая (ФЗГ) и фосфатнезависимая (ФНГ), отличающиеся по физико-химическим свойствам, механизм регуляции и локализации в клетке [5, 7-13]. В частности, наличие многочисленных модуляторов глутаминазы свидетельствует о разных метаболических путях изоферментов.

В данной работе исследовалось влияние различных известных эффекторов на активность изоферментов митохондриальной глутаминазы аэробных инфузорий *Paramecium multimicronucleatum*.

Материал и методика. Объектом исследований являлись *P. multimicronucleatum*, выращенные в среде Сонеборна [15]. Гомогенизацию проводили в стеклянном гомогенизаторе. Фракционирование гомогената осуществляли методом Бради и Бреда [4], модифицированным Палладиным и Кирсенко. Ядерную фракцию отделяли центрифугированием в 0.25М растворе сахарозы при 700g в течение 10 мин. Для получения митохондриальной фракции надосадочную жидкость центрифугировали при 10000g в течение 25 мин. Для промывания полученной митохондриальной фракции была проведена регомогенизация и повторное центрифугирование. В целях разрушения митохондрий полученную взвесь однократно замораживали. Активность глутаминазы определяли методом Зелингсона [16] по количеству аммиака, образовавшегося вследствие гидролиза глутамин, модифицированного Силаковой [1]. Частичную очистку митохондриальной глутаминазы проводили методом ионообменной хроматографии на ДЕАЕ целлюлозе.

Результаты и обсуждение. Известно, что глутаминазы животных тканей и микроорганизмов отличаются друг от друга как структурой, физико-химическими свойствами, так и механизмами регуляции ферментативной активности. Но существуют некоторые бактериальные глутаминазы, которые проявляют свойства фермента животного происхождения [6]. Регуляция ФЗГ и ФНГ обусловлена наличием определенного уровня глутамин и влиянием ряда эффекторов на ферментативную активность. В предыдущих наших работах была исследована регуляция митохондриальной глутаминазы аэробных инфузорий *P. multimicronucleatum* [2]. Методом ионообменной хроматографии была частично очищена митохондриальная глутаминаза, представленная 2 изоферментами [2, 3] (табл. 1).

Таблица 1. Частичная очистка митохондриальной глутаминазы инфузорий *P. multimicronucleatum* методом ионообменной хроматографии, n = 13

Фракции	Общий белок, мг	Общая активность, мкМ NH ₃	Удельная активность, мкМ NH ₃ /мг белка	Очистка	Исход, %
Гомогенат	111±9.52	99±5.68	0.89±0.11	0	100
Митохондрии	48±2.41	82.2±2.28	1.71±0.16	1.92	83
Глутаминаза I	1.98±0.18	45.26±1.51	22.86±1.12	25.69	55.06
Глутаминаза II	0.80±0.08	13.61±1.02	17.01±1.08	19.11	16.56
Глутаминазы I, II	2.78±0.21	58.87±4.48	21.18±1.83	23.8	71.62

С целью утверждения предположения о наличии в митохондриях аэробных инфузорий *P. multimicronucleatum* 2 изоферментов глутаминазы нами исследовалось влияние различных эффекторов на их активность (табл. 2).

Изоферменты митохондриальной глутаминазы инкубировались в присутствии фосфата, цитрата, бикарбоната, пара-хлор-меркурий бензоата, АТФ, аргинина, цитрулина, орнитина, тироксина, дексаметазона и адреналина. Полученные результаты представлены в табл. 2. Как видно из данных таблицы, вышеперечисленные эффекторы по-разному влияют на активность обеих глутаминаз. Глутаминазу I, несомненно, можно считать ФЗГ, т.к. в присутствии фосфата ее активность возрастает почти в 2 раза, достигая величины от 22.86±2.11 мкМ до 38.76±2.28 мкМ. На глутаминазу II фосфат никакого воздействия не оказывает. Исходя из вышеизложенного, можно

предположить, что в митохондриях инфузорий глутаминаза представлена 2 изоферментами: фосфатзависимой и фосфатнезависимой.

Таблица 2. Влияние разных эффекторов на активность митохондриальных глутаминаз I и II (n=16)

Эффектор	Глутаминаза I			Глутаминаза II		
	Активность, мкМ NH ₄ /мг белка	Активность, %	Активация, ингибция, %	Активность, мкМ NH ₄ /мг белка	Активность, %	Активация, ингибция, %
Без эффектора	22.86±2.11	100	0	17.01±1.52	100	0
Фосфат 2.5мкМ	38.76±2.28	170	+70	17.01±1.02	100	0
Пара-хлор-меркурий бензойная к-та 5мкМ	22.86±1.98	100	0	17.01±1.30	100	0
Пара-хлор-меркурий бензойная к-та 10/20мкМ	16.00±1.79	70	-30	19.39±1.41	114	+14
Na-цитрат 50мкМ	22.86±2.11	100	0	33.01±2.18	194	+94
АТФ 2мкМ	40.01±3.50	175	+75	34.02±2.82	200	+100
Аргинин 50мкМ	22.86±1.88	100	0	5.52±0.65	32.5	-67.5
Орнитин 50мкМ	17.6±1.18	77	-27	9.53±0.89	56	-44
Цитрулин 50мкМ	17.6±2.06	77	-27	9.53±1.19	56	-44
NaHCO ₃ 60мкМ	45.95±3.12	201	+101	34.02±2.92	200	+100
Тиоксин 0.1мкМ	67.67±5.15	296	+196	28.92±1.91	170	+70
Дексаметазон 5мкМ	62.87±5.22	275	+175	26.7±2.12	157	+57
Адреналин	45.95±2.28	201	+101	24.83±1.72	146	+48

Интересно влияние пара-хлор-меркурий бензоата на активность обеих глутаминаз, который в количестве 5 мкМ не действует на активность изоферментов, а в количестве 10-20 мкМ ингибирует активность глутаминазы I на 30% (от 22.86±2.11 мкМ до 16.00±1.79 мкМ), что свидетельствует о наличии SH-группы в активном центре фермента. На глутаминазу II пара-хлор-меркурий оказывает слабое активирующее влияние (от 17.01±1.52 мкМ до 19.39±1.41 мкМ). Это можно объяснить тем, что пара-хлор-меркурий бензоата связывается с SH-группами, которые находятся вне активного центра, что приводит к конформационным изменениям и повышению сродства фермента к субстрату.

Цитрат приблизительно в 2 раза активизирует глутаминазу II (от 17.01±1.52 мкМ до 33.01±2.18 мкМ), но не действует на глутаминазу I. АТФ и бикарбонат активизируют обе глутаминазы приблизительно в 2 раза. В присутствии АТФ глутаминаза I активизируется от 22.86±2.11 мкМ до 40.01±3.50 мкМ, а глутаминаза II от 17.01±1.52 мкМ до 34.02±2.82 мкМ. В присутствии бикарбоната активность глутаминаз I и II составляет

45.95±3.12мкМ и 34.02±2.92мкМ соответственно. Аргинин сильно ингибирует активность глутаминазы II, приблизительно на 70% (от 17.01±1.52мкМ до 5.52±0.65мкМ), но никакого воздействия не оказывает на глутаминазу I. Цитрулин и орнитин одинаково ингибируют обе глутаминазы, подавляя активность первого изофермента на 25%, а второго – на 44%. Относительно действия гормонов на оба изофермента глутаминазы нужно отметить, что глутаминаза I более чувствительна к тироксину, дексаметазону и адреналину. Первые два гормона приблизительно в 3 раза, а адреналин в 2 раза активируют глутаминазу I. В присутствии тироксина активность фермента возрастает от 22.86±2.11мкМ до 67.67±5.15мкМ, дексаметазона – до 62.87±5.22 мкМ, а адреналина - до 45.95±2.28мкМ. Глутаминаза II также активируется вышеперечисленными гормонами. В присутствии тироксина активность последней возрастает от 17.01±1.52мкМ до 28.92±1.91мкМ, дексаметазона - до 26.7±2.12мкМ, адреналина - до 24.83±1.72мкМ, т.е. на 70%, 57% и 48% соответственно.

Исходя из вышеизложенного, можно предположить, что в митохондриях аэробных инфузорий *P. multimicronucleatum* присутствуют 2 изофермента глутаминазы, которые отличаются механизмами регуляции, причем глутаминаза I фосфатзависимая, а глутаминаза II – фосфатнезависимая.

ЛИТЕРАТУРА

1. Силакова А.Н., Труш Г.П., Являкова А.А. Вопросы мед. химии, 5, 538, 1962.
2. Тамразян А.А., Карапетян С.А., Давтян М.А. Биолог. журн. Армении, 55, 1-2, 2003.
3. Тамразян А.А. Вестник МАНЭБ, 7,6 (54), 51-55, 2002.
4. Brody F.N., Bain J.A. Biol. Chemistry, 195, 685-692, 1952.
5. Crabtree Ch., Expaзы Mol. Bioserver, 2000.
6. Cumpbell H.A., Mushburn L.T. Biochemistry, 8, 3768, 1969.
7. Curthoys N.P., Wadford H. Annu. Rev. Nutrition, 15, 133- 159, 1995.
8. Duran S. Biochem Genet. 34, 453-465, 1996.
9. Krivasikova Z., Sputrova A., Dzurik R. Physiol Res., 47, 1998.
10. Kvamme E., Torgner I., Robry B. FEBS Letters, 268, PS2-031, 2001.
11. Roberg B., Torgner I., Laake J., Takuma Y. Am. J. Physiology, 273, 3, 2000.
12. Shapiro R.A., Morehouse R.F., Curthoys N.P. Biochem. J., 267, 561-567, 1982.
13. Soberon M., Gonzales A. J. Gen. Microb, 133, 1-8, 1987.
14. Soberon M., Gonzales A. J. Gen. Microb, 153, 11-17, 1988.
15. Soneborn T.M. Methods in Cell Physiology, 4, Pescot, 1970.
16. Zelingson D., Zelingson H. J. Lab. Clinic. Med., 38, 384, 1951.

Поступила 03.III.2005