

УДК 577.152

ИЗОЛИРОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ФОРМ АМР-ДЕЗАМИНАЗЫ ИЗ НЕРВНОЙ ТКАНИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

ШАРОЯН С. Г., МАРДАНЯН С. С., АРУТЮНЯН А. В.

Институт биохимии им. Г. Х. Бунятыана НАН Армении, Ереван

Разработан метод выделения АМР-дезаминаз из различных отделов мозга: серого вещества и впервые из аденогипофиза крупного рогатого скота. Для градиентной элюции фермента с ионообменного сорбента фосфоцеллюлозы РП применен широкий диапазон концентраций KCl (0,2—2,0 М). Разработан чувствительный метод определения ферментативной активности по флуоресценции комплекса о-фталальдегида (ОФА) с продуктом реакции аммиаком. Использование методов позволили показать, что в изученных отделах мозга АМР-дезаминаза представлена в шести молекулярных формах. Проведено также сравнительное исследование некоторых кинетических свойств количественно наиболее доступных форм фермента.

АМР-дезаминаза (КФ 3.5.4.6 АМР-аминогидролиза) в различных животных тканях представлена несколькими молекулярными формами. Ogasawara и соавт. посвятили ряд работ исследованию спектра этих форм ферментов в различных тканях животных [1, 2] и человека [3, 4]. Оказалось, что скелетная мышца, почки и сердце содержат по одной тканеспецифичной форме фермента, а мозг, печень, поджелудочная железа, селезенка, легкие характеризуются присутствием в них нескольких молекулярных форм фермента. Позднее Raggi и соавт. [5] показали существование в мышцах (в зависимости от гистологического типа) двух различных изоформ АМР-дезаминазы. Ogasawara и соавт. [6] и Арутюнян, Ловенштейн [7] исследовали изоферментный состав АМР-дезаминазы мозга животных. Было показано присутствие в мозгу крыс 5-и молекулярных форм фермента, представляющих собой продукт гибридизации в различных соотношениях его двух форм, характерных для сердца (С-форма) и почек (В-форма). Из головного мозга крупного рогатого скота до настоящего времени фермент был выделен лишь в виде одной молекулярной формы [8, 9].

Для получения более обстоятельной информации о природе АМР-дезаминазы нами были предприняты исследования по изучению фермента из различных отделов мозговой ткани крупного рогатого скота. Полученные результаты свидетельствуют о существовании шести молекулярных форм АМР-дезаминазы в гипофизе и сером

веществе мозга, что представляет существенный интерес в развитии представлений об органичной локальной специфичности изученного фермента, выражающейся, в частности, в наличии его молекулярных разновидностей.

Материалы и методы

Определение ферментативной активности АМР-дезаминазы производили в 0,8 мл инкубационной смеси следующего состава: 100 мкл раствора фермента, содержащего примерно 40 мкг белка, 2 мМ АМР, 2 мМ АДР или АТР, 40 мМ имидазол-НСI буфер, рН 7,0. Смесь инкубировали при 37° 10 мин, реакцию останавливали добавлением 0,5 мл этанола. Количество образовавшегося аммиака определяли согласно методикам, указанным в литературе [10—12] с некоторой модификацией. Метод основан на флуоресцировании комплекса ОФА-NH₄ при нейтральных рН в присутствии 2-меркаптоэтанола при $\lambda_{\text{возб.}}$ = 413 нм и $\lambda_{\text{эм.}}$ = 485 нм. Наличие в растворе аминокислот, пептидов и белков не мешает определению аммиака, ибо флуоресценция комплексов ОФА с перечисленными первичными аминами проявляется при значениях рН выше 9,0 и при других параметрах флуоресценции. Для определения аммиака к каждой пробе добавляли по 0,2 мл 0,1-процентного раствора ОФА в 0,1 М К-фосфатном буфере, рН 7,0, содержащем 1,5 мМ 2-меркаптоэтанола. Пробы выдерживали в темноте в течение 1—2 ч. В случаях выпадения белкового осадка его удаляли центрифугированием и измеряли флуоресценцию прозрачного раствора. Содержание контрольных проб было идентично опытным, добавление же этанола производили до начала инкубации. Активность фермента выражали либо в условных единицах флуоресценции, либо же в мкмоль аммиака, образующегося в течение 1 мин. Для этих расчетов была построена калибровочная кривая зависимости относительной флуоресценции комплексов ОФА-NH₄ от концентрации аммиака. В качестве стандарта использовали хлорид аммония. Величину У.А. фермента выражали в мкмоль аммиака/мин/мг белка.

Содержание белка определяли по методу Bradford [13].

Использовали фосфоцеллюлозу РII («Whatman», Англия), ОФА, АМР и GTP («Serva», ФРГ), 2-меркаптоэтанол, АДР и АТР («Sigma», США), а также другие реактивы (х.ч. и ч.д.а.) отечественного производства.

Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре SPECORD UV VIS (ГДР), флуорометрические измерения проводили при комнатной температуре на спектрофлуорометре MPF-44A («Perkin-Elmer», США) в квадратных кюветах с длиной оптического пути 1 см.

Результаты и обсуждение

АМР-дезаминазу из исследованных тканей выделяли идентичным путем, используя обычно применяемые методы очистки фермента [9].

14]. 200 г очищенной от пленок ткани измельчали скальпелем и гомогенизировали в 5-кратном объеме 20 мМ К-фосфатного буфера (А), рН 7,0, в гомогенизаторе РТ-1 при скорости 8000 об/мин в течение 2 мин. Гомогенат центрифугировали при 6000 g на протяжении 1 ч и фильтровали через два слоя марли. К супернатанту добавляли KCl до конечной концентрации 50 мМ и вносили фосфоцеллюлозу, уравновешенную буфером А, содержащим 50 мМ KCl. Смесь размешивали на магнитной мешалке в течение 1 ч и после отстойки надосадочную жидкость сливали. Фосфоцеллюлозу с ад-

Характеристики молекулярных форм АМР-деаминазы из аденогипофиза и серого вещества мозга крупного рогатого скота

Фракция	Концентрация KCl при которой элюируется данная фракция (М)	K _m в реакциях деаминации АМР (мМ)	
		аденогипофиз	серое вещество мозга
I	0,4—0,6	3,0	2,0
II	0,7—0,8	8,0	3,0
III	0,95—1,05	4,0	4,5
IV	1,25—1,27	7,5	6,0
V	1,4—1,5	9,0	—
VI	1,7—1,8	12	—

сорбированными белками промывали тем же буфером и переносили в колонку (×10 см), которую промывали 250-миллилитровым порциями буфера А, содержащего соответственно 0,1 и 0,2 М KCl. Затем применяли градиентную элюцию, используя градиент KCl в буфере А от 0,2 до 2,0 М. На рис. 1 представлены полученные при этом элюционные диаграммы по белку и по АМР-деаминазной активности. Как видно из рисунка, ферментативная активность из обоих источников элюируется в 6-и пиках, и, хотя общий вид профиля элюции по белку и по активности несколько отличается для двух использованных тканей, все 6 изоферментов элюируются примерно при одинаковых концентрациях KCl, приведенных в таблице. Для дальнейшей очистки изоферментов каждую фракцию разбавляли водой в 2—3 раза и снова наносили на колонку с фосфоцеллюлозой, уравновешенной буфером А и содержащей соответствующую концентрацию KCl. После этого белок элюировали буфером А, содержащим 1,5 М KCl для I—III фракций и 2,0 М KCl для IV—VI фракций. Полученные таким образом препараты фермента использовали для кинетических исследований. На рис. 2 представлена типичная зависимость скорости реакции деаминации АМР от концентрации субстрата без регуляторов и в присутствии ADP и АТР для изоферментов II из аденогипофиза (А) и из серого вещества мозга (Б). В таблице приведены значения кажущихся ве-

личин K_m для изоферментов из обеих тканей. Примечательно, что в отсутствие активаторов кривая имеет явно выраженную сигмоидальную форму, а при наличии в реакционной среде АТР или АДР зависимость скорости реакции от концентрации субстрата становится гиперболической, причем АТР является более эффективным активатором, чем АДР. Аналогичные кривые получены для всех изоферментов из обеих тканей. Для оценки числа субстратсвязывающих

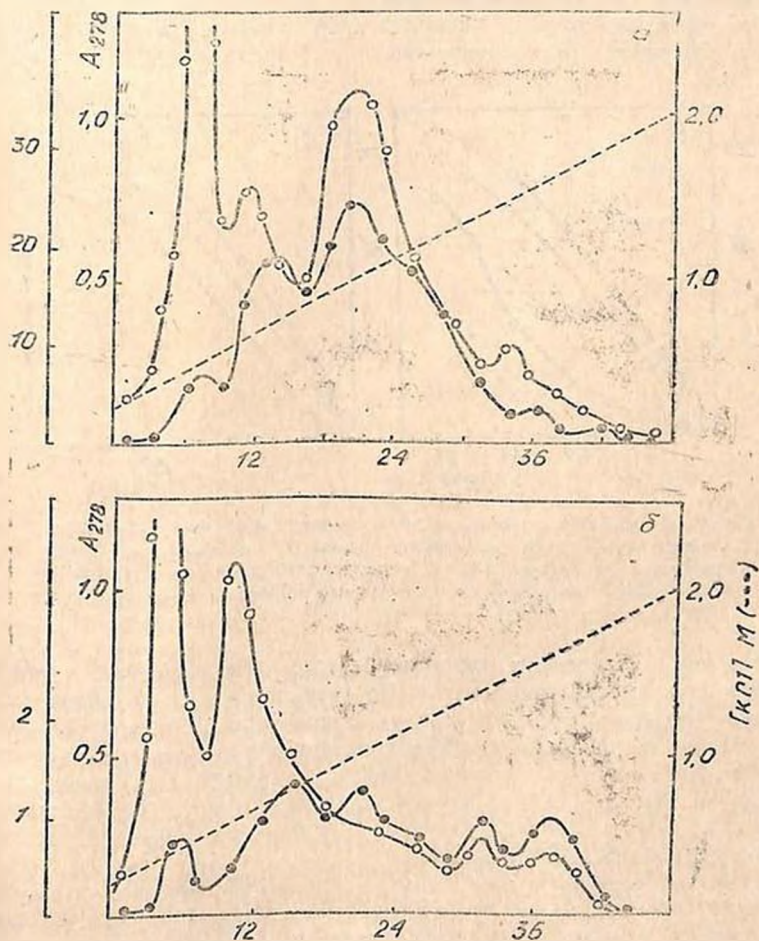


Рис. 1. Хроматография растворимой фракции экстракта аденогипофиза (а) и серого вещества мозга (б) с фосфоцеллюлозной колонки: АМР-деаминазная активность (●—●), поглощение при 278 нм (○—○). Градиент KCl (---) осуществляли между концентрациями 0,2 и 2,0 М объемами по 250 мл. Фракции собирали по 10 мл. По оси абсцисс—номера элюируемых фракций, по оси ординат—активность фракций (мкмоль NH_4 /мин)

центров выделенных изоферментов нами были определены величины n_{ii} , соответствующие наклону прямой зависимости $\lg \frac{v}{V-v}$ от $\lg [S]$. В отсутствие регуляторов и при среднем насыщении фермента субстратом величины n_{ii} для всех фракций оказываются в пределах значений от 3 до 4, ожидаемых для тетрамерных ферментов. В присутствии АТР эти величины принимают значения 1—1,5, что соответствует снятию кооперативности взаимодействия фермента с субстратом и переходу от сигмоидальной зависимости между активностью фермента и концентрацией субстрата к гиперболической (рис. 2).

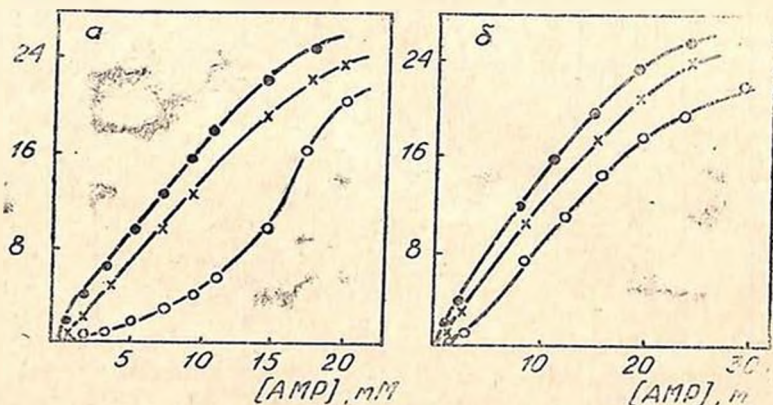


Рис. 2. Зависимость скорости дезаминирования АМР изофермента II аденогипофиза (а) и серого вещества мозга (б) от концентрации АМР в отсутствие регуляторов (○ ○), в присутствии 1,5 мМ АТР (⊕ ⊕), в присутствии 1,5 мМ АДР (* *). По оси абсцисс—концентрация АМР (мМ), по оси ординат—активность фермента (мкмоль $\text{NH}_4/\text{мин}$).

На рис. 3 приведены характерные для всех изученных фракций кривые зависимости ферментативной активности для изофермента II из аденогипофиза от концентрации активатора АТР и ингибитора ГТР. Для этой фракции константа активации, определенная по методу двойных обратных величин, оказалась равной 0,125 ммоль. Величина K_i для ГТР, определенная по методу Дикон [15], равнялась 0,3 ммоль. Эти значения находятся в пределах величин, обычно наблюдаемых для АМР-дезаминаз.

Известно, что ионы одновалентных металлов являются активаторами АМР-дезаминаз из различных источников [16, 17], что подтверждается и в отношении исследованных нами ферментов из мозговой ткани под влиянием ионов калия. На рис. 4 показаны зависимости активности фракций II, полученных из аденогипофиза и серого вещества мозга, от концентрации KCl . В обоих случаях отмечается совпадение оптимумов концентрации ионов в пределах примерно 0,1 М, тогда как при более высоких концентрациях прояв-

ляется ингибирующее влияние на активность фермента. Эта закономерность прослеживалась во всех изученных случаях.

Таким образом, приведенные данные свидетельствуют о наличии шести молекулярных форм АМР-дезаминазы в двух изученных отделах мозговой ткани крупного рогатого скота. Фермент впервые был выделен из аденогипофиза и разделен на молекулярные формы.

Следует заметить, что АМР-дезаминаза из головного мозга крупного рогатого скота была ранее выделена и описана американскими учеными как одна молекулярная форма [8, 9], что создало определенное противоречие с данными других исследователей [6, 7], от-

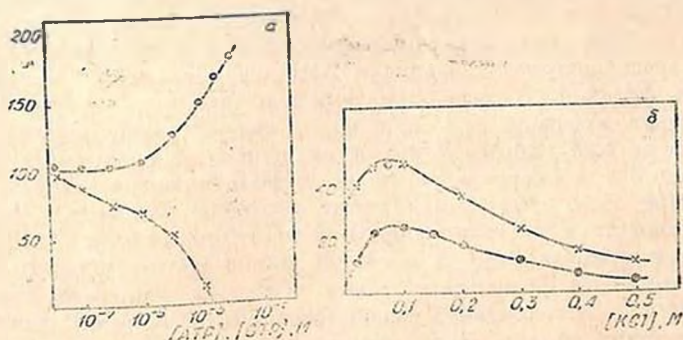


Рис. 3. а—АМР-дезаминазы активности изофермента II из аденогипофиза в зависимости от концентрации АТР (●—●) и ГТР (х—х) при концентрации субстрата 2 мМ. По оси абсцисс—концентрации АТР и ГТР (в М), по оси ординат—активность в %.

б. АМР-дезаминазная активность изоферментов II из аденогипофиза (●—●) и серого вещества мозга (х—х) в зависимости от концентрации КСl. По оси абсцисс—концентрация КСl (в М), по оси ординат—активность в относительных единицах.

мечавших наличие в цельном мозгу крыс пяти изоферментов. Факт обнаружения нами в мозговой ткани шести молекулярных форм АМР-дезаминазы можно объяснить, с одной стороны, применением более широкого диапазона концентраций КСl, использованных для элюции ферментативной активности в диапазоне 0,2—2,0 М. В работах Sellow, Lowenstein [8] и Rhoads [9] при исследовании фермента из мозга крупного рогатого скота использовали градиент КСl 0,1—1 М. Ogasawara и соавт. при исследовании фермента из мозга крыс использовали градиент КСl 0,1—1,2 М [6]. Как видно из рис. 1 и таблицы, большинство молекулярных форм АМР-дезаминазы элюируется с фосфоселлюлозы при концентрациях выше 1 М, что свидетельствует о том, что ограниченный диапазон концентраций при градиентной элюции являлся основной причиной обнаружения лишь одной молекулярной формы АМР-дезаминазы из головного мозга крупного рогатого скота. Обнаружение большего числа молекулярных форм фермента стало возможным благодаря

тому, что для определения его активности нами впервые был применен чувствительный флуорометрический метод—определения аммиака с помощью ОФА, позволяющий выявить с максимальной точностью наномолярные концентрации аммиака в исследуемом растворе в присутствии других аминоксодержащих соединений. Спектрофотометрический и колориметрический (с использованием реактива Несслера) методы, использованные ранее в работах Sellow [8], Rhoads и соавт. [9] не отличались столь высокой степенью точности.

Следует отметить, что профиль, полученный нами при градиентной элюции АМР-дезаминазы (рис. 1), не совпадает с описанным в работах Ogasawara и соавт. [6] и Арутюняна и соавт. [7] для фермента из мозга крыс. Это отличие касается как концентраций КСl, при которых элюируются фракции АМР-дезаминазы, так и величин K_m этих фракций. В некоторых исследованиях [6, 7] элюирование изофермента производилось при более низких концентрациях КСl, в диапазоне 0,25—0,8 М, тогда как в настоящей работе при 0,8 М КСl происходит элюирование лишь второго пика активности фермента. При этом наблюдается также некоторое различие в регуляторных свойствах соответствующих молекулярных форм АМР-дезаминазы, полученных нами из мозговой ткани крупного рогатого скота и описанных для фермента из мозга крыс. Так, например, имеются данные [18], что наличие в пробах уже 50 мМ КСl или NaCl меняет характер зависимости ферментативной активности от концентрации субстрата: кривая из сигмовидной превращается в гиперболическую. В нашем же случае в присутствии этих и более высоких концентраций КСl (100—200 мМ) кривая все еще сохраняет свою сигмовидальную форму. Кроме того, согласно имеющимся данным [18], добавление 2,5 мМ АТР оказывает стимулирующее воздействие на активность фермента, изменяя форму кривой только для фракций, элюируемых при низких концентрациях КСl. Фракции же, элюируемые при более высокой ионной силе (0,75 М КСl), остаются нечувствительными к добавке АТР. Полученные нами результаты свидетельствуют об одинаковой степени чувствительности, проявляемой всеми молекулярными формами фермента из мозговой ткани к измененной концентрации АТР.

В настоящее время продолжают исследования по очистке описанных фракций с целью проведения более тщательных кинетических определений и выяснения изоферментной картины АМР-дезаминазы из мозговой ткани крупного рогатого скота.

ISOLATION OF AMP-DEAMINASE MOLECULAR FORMS FROM THE CATTLE NERVE TISSUE

SHAROYAN S. G., MARDANIAN S. S., HAROUTJUNIAN A. V.

H. Ch. Puniatian Institute of Biochemistry, Acad. Sci. of Armenia,
Yerevan

It is worked out an assay for AMP-deaminase isolation from different parts of brain: from grey substance and, for the first time from the cattle's adenohypophysis. For the gradient elution of the enzyme from the affinity sorbent of PII phosphocellulose it is used a large scale of KCl concentrations (0,2—2,0 M). It is worked out a sensitive method for determination of enzyme activity on fluorescence of O-phthalaldehyde complex with ammonia, the product of reaction. The methods used let us show that in the studied parts of brain the AMP-deaminase is represented in six molecular forms. Comparative investigation of some kinetic properties of one enzyme form (in more available quantities) is made.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Ogasawara N., Goto H., Yamada Y., Watanabe T. Eur. J. Biochem., v. 87, p. 297—304, 1978.
2. Ogasawara N., Goto H., Yamada Y. Comp. Biochem. Physiol., v. 76B, p. 471—473, 1983.
3. Ogasawara N., Goto H., Yamada Y., Watanabe T., Asano T. Biochim. Biophys. Acta, v. 714, p. 298—306, 1982.
4. Ogasawara N., Goto H., Yamada Y., Watanabe T. Int. J. Biochem., v. 16, p. 269—273, 1984.
5. Raggi A., Bergamini C., Ronga G. FEBS Letters, v. 58, p. 19—23, 1975.
6. Ogasawara N., Goto H., Watanabe T. FEBS Letters, v. 8, p. 245—248, 1975.
7. Арутюнян А. В., Ловенштейн Дж. Докл. АН СССР, т. 234, с. 951—954, 1977.
8. Sellow B., Lowenstein J. J. Biol. Chem., v. 242, p. 607—615, 1967.
9. D. Rhoads Ph. D. Thesis, Waltham, Mass. Brandeis University, 1969.
10. Sugawara K., Oyama F. J. Biochem., v. 89, p. 771—774, 1981.
11. Goyal S., Rains D., Kufner J. Anal. Chem., v. 60, p. 175—179, 1988.
12. Молочкина Е., Боровок Н. Нейрохимия, т. 8, с. 311—312, 1989.
13. Bradford M. Anal. Biochem., v. 72, p. 248—254, 1975.
14. Smiley K., Suelter C. J. Biol. Chem., v. 242, p. 1980—1985, 1967.
15. Dixon M. Biochem. J., v. 55, p. 170—176, 1953.
16. Sellow B., Lowenstein J. J. Biol. Chem., v. 243, p. 6216—6221, 1968.
17. Арутюнян А. Вопр. биохимии мозга, т. 9, с. 251—272, 1974.
18. Ogasawara N., Goto H., Watanabe T., Kawamura Y., Yoshino M. Biochim. Biophys. Acta, v. 364, p. 353—361, 1974.

Поступила 8. V. 1998