



УДК 577.151.042

ОСОБЕННОСТИ РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ МЕМБРАНОСВЯЗАННОЙ ФОСФАТЗАВИСИМОЙ ГЛУТАМИНАЗЫ СИНАПСОМ И МИТОХОНДРИИ КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА.

АМБАРЦУМЯН В. Г., ВАРТАНЯН А. Г., ОГАНЕСЯН В. С.

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

Установлено, что стимулирующее действие цитрата (ЦТ), малеата (МТ), сукцината (СК), N-ацетил-L-аспартата (ААК) и аспартата (АК) на активность мембраносвязанной фосфатзависимой глутаминазы (ФЗГ) митохондрий в присутствии низких концентраций L-тироксина (T_4) и 3,3',5-трийод-L-тирозина (T_3) потенцируется сильнее, чем при применении высоких концентраций гормонов. Однако в синапсосомах усиление эффекта всех испытанных модуляторов наблюдается только при применении высоких концентраций T_4 и T_3 , а в присутствии низких концентраций гормонов действие СК, ААК и АК вообще не потенцируется.

При сочетании применения АК, ААК, СК, ЦТ и МТ с фосфатом в митохондриях происходит 2-3-кратное усиление их действия на активность фермента, между тем как в синапсосомах действие этих соединений в присутствии фосфата не потенцируется.

Показано, что как в синапсосомах, так и в митохондриях усиление действия ЦТ, МТ и других модуляторов наблюдается в присутствии сравнительно низких концентраций 3,3',5-трийодтиреоксусной кислоты (T_3 УК), а при применении высоких концентраций T_3 УК (0,1 мкмоль/мл), в отличие от действия T_4 и T_3 , полностью исчезает эффект потенцирования и активность фермента падает до исходного уровня.

Полученные данные указывают на неидентичность регуляторных свойств мембраносвязанной ФЗГ синапсосом и митохондрий.

В мозговой ткани деамидирование глутамина в основном осуществляется ФЗГ, которая локализована как в синапсосомах, так и в митохондриях.

В синапсосомах она представлена только в мембраносвязанной форме, а в митохондриях как в связанной, так и в растворимой формах [1]. Регуляция активности глутаминазы с участием модуляторов различной физиологической природы носит сложный и поливалентный характер [2—6]. Установлено, что тиреоидные гормоны (ТГ) являются эффективными аллостерическими модуляторами этого фермента и, обладая специфическим действием, занимают центральное место в регуляции активности как мембраносвязанной, так и растворимой ФЗГ мозга и почек крыс [6—9]. Мембраносвязанная ФЗГ синапсосом и митохондрий по своим регуляторным и кинетическим свойствам во многом принципиально отличается от растворимой формы этого фермента [6, 9, 10]. Кроме того, обнаружены отличия и в

регуляторных свойствах глутаминазы митохондриальной и синапсомной фракции [10].

Настоящие исследования проводились с целью выявления новых отличительных особенностей регуляции активности мембраносвязанной ФЗГ синапсом и митохондрий с участием различных модуляторов как гормональной, так и негормональной природы.

Материалы и методы

В качестве источника фермента использовали синапсомную и митохондриальную фракции, полученные из коры мозга крыс. Для получения синапсомы и очищенных митохондрий, грубую митохондриальную фракцию, выделенную по ранее описанной методике [11], подвергли дифференциальному центрифугированию в градиенте плотности сахарозы по методу Whittaker [12]. Полученные митохондриальную и синапсомную фракции суспензировали в 0,2 М трис-НСI буфере, замораживали и размораживали при -20° 6 раз. С целью освобождения от растворимой глутаминазы суспензии центрифугировали при 17000 g 30 мин. Полученный осадок митохондрий и синапсомы суспензировали в 0,2 М трис-НСI буфере из расчета 600, 700 мкг белка в 0,5 мл соответственно и использовали в качестве источника фермента.

Количество белка в фракциях определяли по методу Lowry и соавт. [13]. Инкубационная среда в объеме 1,5 мл содержала 0,5 мл ферментного препарата, 20 мМ L-глутамин; в зависимости от поставленной задачи в нее добавляли активаторы T_4 («Reanal», Венгрия), T_2 , T_3 УК («Sigma», США), АК, ААК, СК, ЦТ, МТ и $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ в различных концентрациях.

Реакционную смесь инкубировали 15 мин при 37° и постоянном встряхивании. Реакцию останавливали добавлением 0,3 мл 10%-ной ТХУ. О глутаминазной активности судили по количеству образовавшегося аммиака, который определяли методом Зелингсона в модификации Силаковой и соавт. [14].

Результаты и обсуждение

В первой серии опытов нами было изучено влияние АК, ААК, СК, ЦТ и МТ на активность мембраносвязанной ФЗГ синапсомы и очищенных митохондрий мозга крыс в присутствии T_4 , T_2 и T_3 УК. Результаты этих исследований представлены на рис. 1, 2 и 3. Первоначальные точки кривых показывают активность фермента в присутствии АК, ААК, СК, ЦТ и МТ, добавленных в отдельности. Как можно заметить, вышеуказанные соединения в отсутствие ТГ стимулируют активность как синапсомной, так и митохондриальной глутаминазы. Среди использованных соединений наиболее эффективными оказались ЦТ и МТ, а наименее—АК. При одновременном добавлении АК, ААК, СК, ЦТ и МТ с различными концентрациями ТГ как в синапсомах, так и в митохондриях происходит заметное потенцирование их стимулирующего действия. Однако, как видно из приведенных данных, потенцирование как в синапсомах, так и в митохондриях в зависимости от концентрации ТГ и от природы второго модулятора проявляется в различной степени. Так, в синапсомах в присутствии низкой концентрации T_2 и T_3 (0,0125 мкмоль/мл) заметное потенцирование наблюдается только при применении ЦТ и МТ, а при добавлении остальных модуляторов активность фермент-

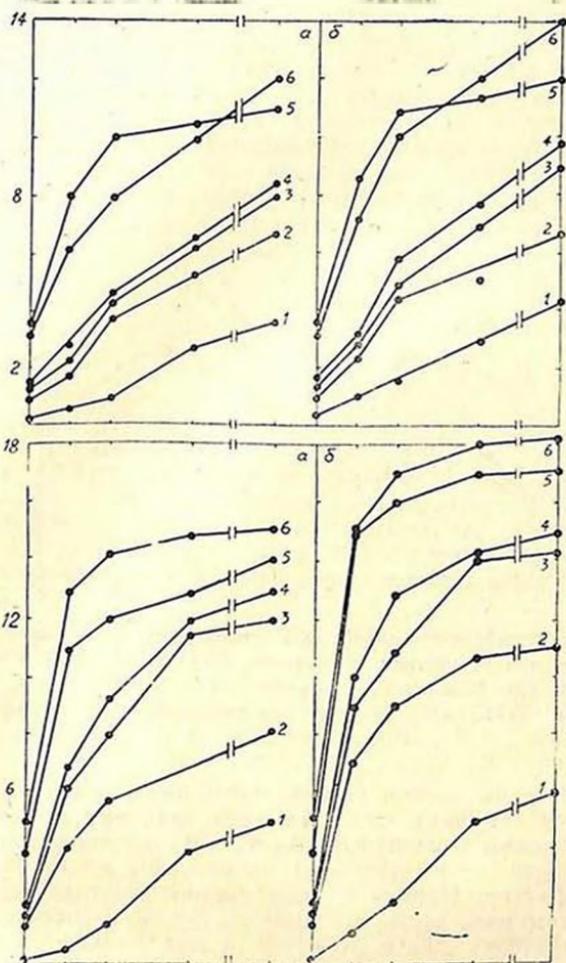


Рис. 1. Действие АК, ААК, СК, ЦТ и МТ (25 мкмоль/мл) на активность мембраносвязанной ФЭГ синапсом в присутствии различных концентраций T_4 (а) и T_3 (б), рН 8,0. 1—контроль; 2—АК; 3—ААК; 4—СК; 5—ЦТ; 6—МТ. По оси абсцисс—концентрация тиреоидных гормонов, мМ; по оси ординат—активность фермента, мкмоль NH_3 /мг белка, $n=10$

Рис. 2. Действие АК, ААК, СК, ЦТ и МТ (25 мкмоль/мл) на активность мембраносвязанной ФЭГ очищенных митохондрий в присутствии различных концентраций T_4 (а) и T_3 (б), рН 8,0. 1—контроль; 2—АК; 3—ААК; 4—СК; 5—ЦТ; 6—МТ. По оси абсцисс—концентрация тиреоидных гормонов, мМ; по оси ординат—активность фермента, мкмоль NH_3 /мг белка, $n=10$

та возрастает лишь за счет суммирования их эффекта, между тем как в митохондриях (рис. 2, а, б) в присутствии этой же концентрации T_4 и T_3 потенцирование наблюдается со всеми испытанными эффекторами, а при одновременном применении АК ААК и СК с низкой концентрацией как T_4 , так и T_3 , в отличие от синапсом, происходит

многократное усиление их эффекта. Действие остальных модуляторов потенцируется заметно слабее. В то же время при концентрации ТГ, равной 0,025 мкмоль/мл, как в синапсосах, так и в митохондриях потенцирование наблюдается со всеми применяемыми модуляторами независимо от их природы и проявляется примерно в одинаковой степени. При дальнейшем повышении концентрации ТГ степень потенцирования со всеми модуляторами и в синапсосах, и в митохондриях постепенно уменьшается, а уровень активности практически

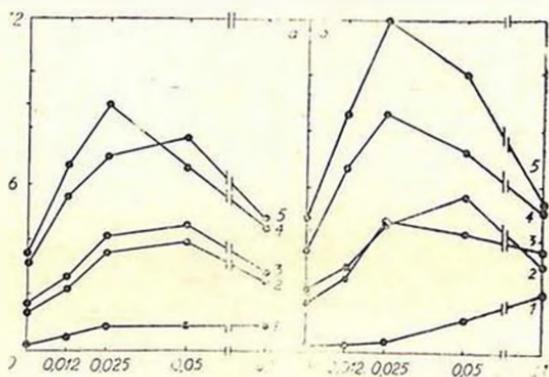


Рис. 3. Активность мембраносвязанной ФЗГ синапсосом (а) и очищенных митохондрий (б) мозга при совместном применении Т₃УК с АК, ААК, СК, ЦТ и МТ (25 мкмоль/мл) рН 8,0. 1—контроль; 2—ААК; 3—СК; 4—МТ; 5—ЦТ. По оси абсцисс—концентрация Т₃УК, мМ; по оси ординат—активность фермента, мкмоль NH₃/мг белка, n=8–10

не меняется. С точки зрения поставленной перед нами задачи, интерес представляет тот факт, что в синапсосах при применении АК, ААК и СК с низкими концентрациями Т₄ и Т₃ потенцирования не происходит и, в отличие от митохондрий, их действие в этом случае носит аддитивный характер. Наряду с этим можно заметить, что митохондриальная глутаминаза обладает более высокой чувствительностью к совместному действию ЦТ и МТ с ТГ и имеет более высокое значение V_{max}.

Примечательно, что, в отличие от мембраносвязанной ФЗГ, растворимая глутаминаза мозга практически не активируется ЦТ, МТ, АК, ААК, СК, АК и ТГ, добавленными в отдельности. Однако при сочетании применения этих соединений с Т₃ происходит очень резкое повышение активности фермента, а при их одновременном применении с Т₄ не наблюдается сколько-нибудь заметного стимулирования активности глутаминазы [6, 9]. Показано, что кинетика активации мембраносвязанной ФЗГ фосфатом также отличается от растворимой формы фермента [15, 16].

В следующей серии опытов изучили влияние АК, ААК, СК, ЦТ и МТ на активность мембраносвязанной ФЗГ синапсосом и митохондрий в присутствии Т₃УК. Результаты этих исследований, приведенные на рис. 3, а, б, показывают, что действие указанных модуляторов на активность мембраносвязанной ФЗГ синапсосом и митохондрий в присутствии Т₃УК в зависимости от ее концентрации проявляется по-разному. Как в синапсосах, так и в митохондриях мак-

симальное усиление действия ЦТ, МТ и других модуляторов в присутствии Т₃УК происходит при ее концентрации, равной 0,025 мкмоль/мл, и по сравнению с эффектом Т₄ и Т₃ оно выражено несколько слабее. Однако, в отличие от действия Т₄ и Т₃, при применении сравнительно высоких концентраций Т₃УК (0,1 мкмоль/мл) эффект потенцирования полностью исчезает и активность фермента падает до исходного уровня.

Из приведенных данных видно, что в регуляции активности мембраносвязанной ФЗГ синапсом и митохондрией с участием Т₃УК и других модуляторов нет никаких отличий. Однако исследования, проведенные с растворимой глутаминазой показали, что стимулирующее действие ЦТ, МТ и других эффекторов при применении высоких концентраций Т₃УК подчиняется иным закономерностям. С повышением концентрации Т₃УК активность растворимой глутаминазы не только не падает, а напротив, быстро растет.

Ранее рядом авторов было показано, что одновременное при менение фосфата с другими модуляторами приводит к усилению их действия на активность глутаминазы как грубой митохондриальной фракции, так и очищенного фермента мозга [17—19]. В связи с этим в следующей серии опытов мы изучили влияние АК, ААК, СК, ЦТ и МТ на активность глутаминазы синапсом и митохондрией в присутствии фосфата. Из результатов, представленных на рис. 4, а, б, примечательным является то обстоятельство, что в митохондриях при сочтании фосфата с указанными эффекторами наблюдается 2—3-кратное усиление их стимулирующего действия, между тем как в си-

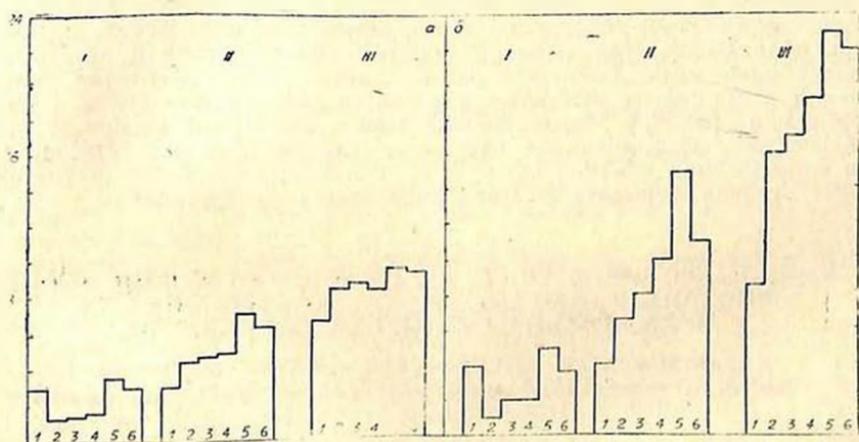


Рис. 4. Активность мембраносвязанной ФЗГ синапсом (**а**) и очищенных митохондрий (**б**) мозга при совместном применении различных концентраций фосфата с АК, ААК, СК, ЦТ и МТ (25 мкмоль/мл), рН 8,0. I—активность фермента в присутствии различных модуляторов, добавленных в отдельности. 1—фосфат 5 мкмоль/мл; 2—АК; 3—ААК; 4—СК; 5—ЦТ; 6—МТ. II—активность фермента при совместном применении АК, ААК, СК, ЦТ и МТ с фосфатом (5 мкмоль/мл). 1—фосфат 5 мкмоль/мл (Ф₅); 2—АК+Ф₅; 3—ААК+Ф₅; 6—МТ+Ф₅. III—активность фермента при совместном применении АК, ААК, СК, ЦТ и МТ с фосфатом (10 мкмоль/мл). 1—фосфат 10 мкмоль/мл (Ф₁₀); 2—АК+Ф₁₀; 3—ААК+Ф₁₀; 4—СК+Ф₁₀; 5—ЦТ+Ф₁₀; 6—МТ+Ф₁₀. По оси ординат—активность фермента, мкмоль NH₂/мг белка.

$n=8-10$

наптосомах потенцирование не происходит. Таким образом, в случае митохондриального фермента фосфат вступает в положительное кооперативное взаимодействие с АК, ААК и другими активаторами, а в опытах с глутаминазой синаптосом эти же соединения на активность фермента действуют аддитивно. В этой связи интерес представляют результаты ранее проведенных исследований с применением фосфата и Т₃УК. Оказалось, что в митохондриях эффект фосфата на глутаминазу в присутствии низких концентраций Т₃УК (0,0125 мкмоль/мл) сильно потенцируется, однако с повышением ее концентрации потенцирование постепенно уменьшается и полностью исчезает в присутствии 0,1 мкмоль/мл Т₃УК, между тем как в синаптосомах эффект фосфата потенцируется и в присутствии высоких концентраций Т₃УК [10].

На основании вышеприведенных данных можно прийти к выводу, что регуляторные свойства мембраносвязанной ФЗГ синаптосом и очищенных митохондрий хотя и во многом сходны, в то же время обладают выраженными отличительными особенностями. В настоящее время трудно объяснить, чем обусловлены эти отличия. Можно предположить, что мембраносвязанная ФЗГ синаптосом и митохондрий либо являются различными изоферментами, либо представляют собой различные агрегированные формы фермента. Недавно в нашей лаборатории было показано, что кратковременная предварительная инкубация растворимой глутаминазы мозга в присутствии Т₃ или Т₃УК в сочетании с другими эффекторами приводит к агрегации исходной формы фермента. В зависимости как от характера тиреоидных соединений, так и от второго эффектора, применяемых при преникубации глутаминазы, образуются новые агрегированные формы фермента, обладающие совершенно отличными кинетическими и регуляторными свойствами. Здесь необходимо отметить, что в регуляции активности глутаминазы участвуют и такие соединения, как белки и фосфолипиды [20, 21]. Можно сделать вывод, что именно различное белковое или фосфолипидное окружение глутаминазы в митохондриях и синаптосомах тем или иным образом обуславливают регуляторные отличия фермента в этих субцеллюлярных частицах.

ASPECTS OF THE ACTIVITY CONTROL OF MEMBRANE-BOUND PHOSPHATE GLUTAMINASE OF SYNAPTOSOMES AND MITOCHONDRIA OF THE CEREBRAL CORTEX

AMBARTSUMYAN V. G., VARTANYAN A. G., OGANESYAN V. S.

Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the Armenia U.S.S.R.

We have demonstrated that the stimulating effect of citrate, malate, succinate, N-acetyl-L-aspartate and aspartate on the activity of membrane-bound phosphate-dependent glutaminase (PDG) of mitochondria in the presence of low concentrations of L-thyronine (T₄) and 3,3',5-triiod-L-thyronine (T₃) is potentiated to a larger extent than when the high levels of hormones are used. However, in synaptosomes the increased effect of all the above modulators can be seen only in the presence of high T₄ and T₃ concentrations; in the presence of low hormone level the effect of succinate, N-acetyl-L-aspartate and aspartate is not potentiated at all. When citrate, malate, succinate, N-acetyl-L-aspartate and aspartate are added together with phosphate to mitochondria, their effect on the

enzyme activity is increased 2—3 times, whereas these compounds do not have any additional effect on synaptosomal enzyme in the presence of phosphate.

Both in synatosomes and in mitochondria the enhanced effects of modulators can be observed in the presence of relatively low levels of 3,3',5'-triodoiodoacetic acid (T_3AA) whereas in the presence of high concentrations of T_3AA (0.1 μ mole/ml) in contrast to T_3 and T_4 , potentiation disappears completely and the activity of the enzyme decreases down to the initial level. These data point out to nonidentical regulatory properties of the membrane-bound phosphate-dependent glutaminase in synaptosomes and mitochondria.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Nimmo G. A., Tipton Kf. J. Neurochem., v. 33, p. 1083—1094, 1979.
2. Оганесян В. С., Бунятыан Г. Х., Бадалян Л. Л., Микиртумова К. С. Вопр. биохимии мозга, т. 6, с. 5—13, Ереван, Изд-во АН АрмССР, 1970.
3. Kvatnne E., Torgner I. A. FEBS Lett., v. 47, p. 244—247, 1974.
4. Kvatnne E., Torgner I. A. Biochem. J., v. 149, p. 83—91, 1975.
5. Бадалян Л. Л., Бунятыан Г. Х., Оганесян В. С. Вопр. биохимии мозга, т. 10, с. 40—54, Ереван, Изд-во АН АрмССР, 1975.
6. Беджанян К. Д., Бадалян Л. Л., Оганесян В. С. Нейрохимия, т. 4, с. 379—387, 1985.
7. Оганесян В. С., Бадалян Л. Л., Микиртумова К. С., Саакян Ж. Дж. Вопр. биохимии мозга, т. 8, с. 77—89, 1973.
8. Саакян Ж. Дж., Оганесян В. С. Биол. журн. Армении, т. 35, с. 264—271, 1982.
9. Оганесян В. С., Бадалян Л. Л., Беджанян К. Д. Нейрохимия, т. 7, с. 558—565, 1988.
10. Оганесян В. С., Амбарцумян В. Г., Беджанян К. Д. Нейрохимия, т. 3, с. 372—381, 1984.
11. Палладиан А. В., Кирсеико О. Б. Биохимия, т. 26, с. 385—390, 1961.
12. Whittaker V. P., Barker L. A. Methods of Neurochem., v. 2, p. 1—52, 1972.
13. Lowry O. H., Rosenbrough N. T., Farr A. L., Randall R. G. J. Biochem., v. 193 p. 265—275, 1951.
14. Силаксова А. И., Труш Г. П., Являкова А. Вопр. мед. химии, т. 5, с. 538—545, 1962.
15. Nimmo G. A., Tipton Kf. Biochem. Pharmacol., v. 30, p. 1635—1641, 1981.
16. Nimmo G., Tipton Kf. Eur. J. Biochem., v. 117, p. 57—64, 1981.
17. Weit-Matherbe H. J. Neurochem., 16, p. 855—864, 1969.
18. Оганесян В. С., Бунятыан Г. Х., Микиртумова К. С., Бадалян Л. Л. Вопр. биохимии мозга, т. 5, с. 5—16, Ереван, Изд-во АН АрмССР, 1969.
19. Szeppeby G. J. Neurochem., v. 18, p. 2201—2208, 1971.
20. Оганесян В. С., Бадалян Л. Л., Беджанян К. Д. Нейрохимия, т. 5, с. 200—201, 1986.
21. McEwan J. D., Bradford N. W. Biochem. J., v. 214, p. 649—652, 1983.

Поступила 15. X. 1989