



РЕГУЛЯТОРНЫЕ СВОЙСТВА МЕМБРАНОСВЯЗАННОЙ ФОСФАТЗАВИСИМОЙ ГЛУТАМИНАЗЫ СИНАПТОСОМ И МИТОХОНДРИЙ КОРЫ МОЗГА КРЫС

ОГАНЕСЯН В. С., АМБАРЦУМЯН В. Г., БЕДЖАНЯН К. Д.

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

Установлено, что тиреоидные гормоны и их аналоги (тиреоидные соединения—ТС) являются эффективными активаторами глутаминазы синапсом и очищенных митохондрий. При совместном применении ТС с фосфатом наблюдается значительное потенцирование их стимулирующего действия на активность как синапсомного, так и митохондриального ферментов. Однако высокие концентрации 3, 3',5-трийодтиреоксусной кислоты в сочетании с фосфатом приводят к резкому падению активности митохондриального фермента, между тем как в синапсоме этого не наблюдается.

При низких значениях pH глутаминовая кислота (ГК) подавляет активирующее действие всех эффектов, добавленных в отдельности, а при совместном применении ТС и фосфата эффект ГК в обеих фракциях полностью устраняется. Однако кривая зависимости активности фермента от концентрации ТС в синапсоме носит сигмовидный характер, а в митохондриях—гиперболический.

При высоких значениях pH ГК сильно потенцирует эффект ТС, в то время как в его присутствии стимулирующее действие фосфата продолжает ослабевать.

Полученные данные показывают, что регуляторные свойства глутаминазы синапсом и митохондрий не совсем идентичны.

Одним из источников ГК—нейромедиатора, обладающего возбуждающим действием на деятельность ЦНС, является глутамин, гидролитический распад которого осуществляется фосфатзависимой глутаминазой (ФЗГ), локализованной в синапсоме и митохондриях [1—3]. Надо отметить, что в синапсоме она представлена только в мембраносвязанной форме, а в очищенных митохондриях как в связанной, так и растворимой формах [4].

Известно, что в отсутствие активаторов глутаминаза обладает очень низкой каталитической активностью и стимулируется целым рядом различных соединений физиологической природы [5—7].

Ранее нами было проведено разностороннее изучение регуляторных свойств ФЗГ митохондриальной фракции мозга, а также других органов крыс и установлено, что среди множества ее активаторов ТС являются одними из эффективных аллостерических модуляторов этого фер-

мента и, обладая специфическим действием, занимают центральное место в регуляции его активности [8—10].

Следует отметить, что регуляция растворимой и митохондриальной глутаминазы мозга и почек с участием ТС во многом принципиально отличается друг от друга [11—13]. В то же время регуляторные свойства ФЗГ, локализованной в синапсосах, мало изучены, а роль ТС в процессе регуляции ее активности вообще не исследована. В связи с этим было интересно изучить регуляцию активности ФЗГ синапсом и митохондрией с участием ТС и выяснить, существуют ли отличительные особенности в их регуляции.

Материалы и методы

В качестве источника фермента использовали синапсомную и митохондриальную фракции, полученные из коры мозга беспородных крыс. Для получения синапсом и митохондрий грубую митохондриальную фракцию, выделенную по ранее описанной методике [14], подвергали дифференциальному центрифугированию в градиенте плотности сахарозы по методу Whittaker [15]*. Полученные митохондриальную и синапсомную фракции, суспензированные в 0,2 М трис-НСl буфере, замораживали и размораживали при -20° 6 раз для освобождения от растворимой глутаминазы. Затем суспензии оставляли при -20° в течение 20 ч, после чего размораживали и центрифугировали при 17000g 30 мин. Осадок митохондрий и синапсом снова суспензировали в трис-НСl буфере из расчета 0,6 и 0,8 мг белка в 0,5 мл соответственно.

Количество белка в фракциях определяли по методу Lowry и соавт. [16].

Инкубационная среда в объеме 1,5 мл содержала: 0,5 мл ферментного препарата, L-глутамин—20 мМ и в зависимости от поставленной цели активаторы L-тироксин- T_4 («Reanal»), 3, 3', 5-трийод-L-тиронин- T_3 («Sigma»), 3,5-дйод-L-тиронин- T_2 («Sigma»), 3, 3', 5-трийод-тиреоуксусную кислоту- T_3 УК («Sigma»), $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ и глутаминовую кислоту-ГК («Sigma») в различных концентрациях.

Реакционную смесь инкубировали 15 мин при 37° и постоянном встряхивании, реакцию останавливали добавлением 0,3 мл 10%-ной трихлоруксусной кислоты. О глутаминазной активности судили по количеству образовавшегося аммиака, который определяли микродиффузионным методом [17].

Результаты и обсуждение

В первой серии опытов нами было изучено влияние различных ТС на активность связанной глутаминазы синапсом и митохондрий. Результаты этих исследований, представленные на рис. 1, показывают, что ТС оказывают стимулирующее действие на активность как синап-

* Чистоту фракций контролировали в электронном микроскопе.

тосомной, так и митохондриальной глутаминазы, и оптимум pH их действия находится в пределах 8,0—9,0. Наиболее эффективным среди гормональных препаратов и в синаптосомах и в очищенных митохондриях является T_3 , а наименее— T_2 . Оказалось, что митохондрии обладают более высокой глутаминазной активностью, чем синаптосомы.

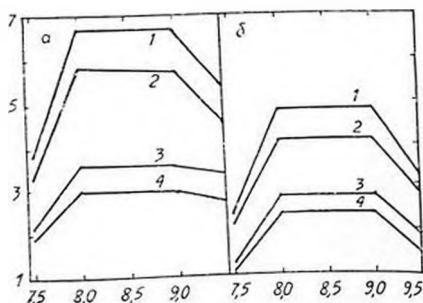


Рис. 1. Влияние тиреоидных соединений на активность глутаминазы митохондрий (а) и синаптосом (б) в зависимости от pH среды. 1—активность фермента в присутствии T_3 ; 2— T_4 ; 3— T_3 УК; 4— T_2 . По оси абсцисс—значение pH среды; по оси ординат—активность фермента, $\mu\text{моль NH}_3/\text{мг белка}$. $n=8-10$.

Ранее было установлено, что ТС способны значительно усиливать стимулирующее действие других модуляторов глутаминазы [10, 18]. В связи с этим было исследовано совместное влияние ТС и фосфата на глутаминазную активность синаптосом и митохондрий. Как показывают данные, представленные на рис. 2, при сочетанном применении 5 мМ фосфата и различных концентраций T_4 , T_3 и T_3 УК как в синаптосомах, так и в митохондриях наблюдается значительное потенцирование их стимулирующего действия при разных уровнях исходной активности. Однако при изучении свойств митохондриального фермента была обнаружена одна примечательная особенность. Оказалось, что эффект потенцирования при применении низких концентраций (0,0125 мМ) T_3 УК происходит сильнее, чем в случае T_4 и T_3 , а при сравнительно высоких ее концентрациях (0,05 мМ) он полностью исчезает и активность фермента резко падает. Между тем как в опытах с T_4 и T_3 при повышении их концентрации активность фермента растет. В то же время в синаптосомах при одновременном применении 5 мМ фосфата и 0,05 мМ T_3 УК глутаминазная активность продолжает расти, а в присутствии 0,1 мМ ее уровень не меняется.

Полученные данные свидетельствуют о том, что в обеих фракциях наблюдается положительное гетеротропное взаимодействие между эффектом фосфата и ТС. С точки зрения поставленной задачи наибольший интерес представляет то, что при применении высоких концентраций T_3 УК с фосфатом активность митохондриальной глутаминазы резко падает, а в аналогичных опытах, проведенных с синаптосомным ферментом, этого не наблюдается. Наряду с этим можно заметить, что глутаминаза этих фракций отличается величиной V и чувствительностью к указанным эффекторам.

Известно, что ГК является конечным продуктом реакции и мощным физиологическим ингибитором глутаминазы мозга [19]. Поскольку в мозгу она представлена в достаточно большом количестве, Ка-

типина и соавт. приходят к заключению, что ФЗГ этой ткани постоянно находится в ингибированном состоянии и может функционировать только в тех исключительных случаях, когда содержание ГК резко падает и фермент освобождается от ее ингибирующего действия [19]. Однако нами было показано, что тормозящее действие ГК полностью устраняется при сочетании применения фосфата с T_4 [20].

Учитывая эти данные, в следующей серии опытов изучали действие ГК на активность фермента синапсом и очищенных митохондрий при совместном применении T_4 , T_3 , T_2 и $T_3УК$ с фосфатом.

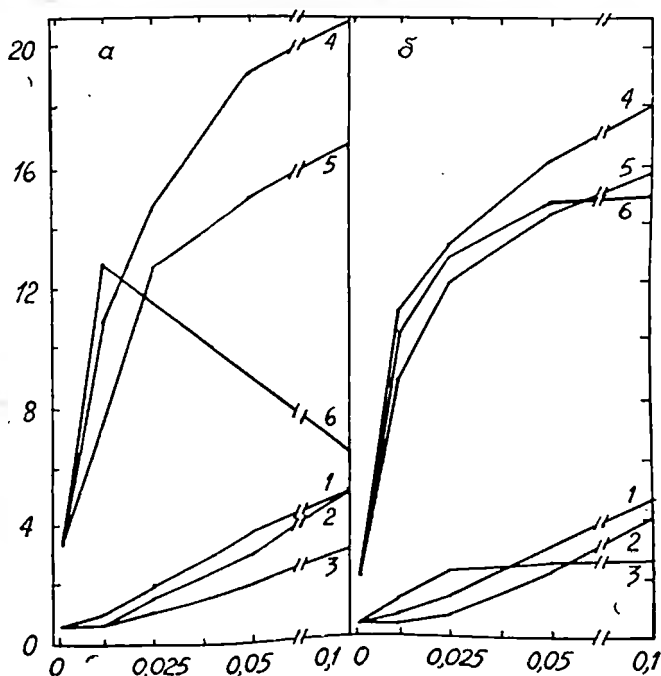


Рис. 2. Влияние совместного применения 5 мМ фосфата (Φ_5) и различных концентраций тиреоидных соединений на активность митохондриальной (а) и синаптической (б) глутаминазы (рН 8,0). 1—активность фермента в присутствии T_3 ; 2— T_4 ; 3— $T_3УК$; 4— $T_3 + \Phi_5$; 5— $T_4 + \Phi_5$; 6— $T_3УК + \Phi_5$. По оси абсцисс—концентрация тиреоидных соединений, мМ; по оси ординат—активность фермента, мкмоль NH_3 /мг белка. $n=10$

Как выяснилось из этих исследований (рис. 3, 1), стимулирующий эффект 10 мМ фосфата как в синапсомах, так и в митохондриях в присутствии 20 мМ ГК почти полностью подавляется, а эффект ТС вообще не проявляется. Однако при их совместном применении тормозящий эффект ГК устраняется, а активность фермента в зависимости от концентрации и природы применяемых гормональных препаратов возрастает в разной степени. Как можно заметить из приведенных данных, при применении низких концентраций гормонов в обеих фракциях тормозящее действие ГК менее всего выражено в случае совместного при-

менения T_3 УК и фосфата, а кривая зависимости активности фермента от концентрации T_3 УК как в синапсосамах, так и в митохондриях имеет гиперболическую форму. Однако в аналогичных опытах с применением T_4 , T_3 и T_2 с 10 мМ фосфата кинетика активации глутаминазы этих фракций носит иной характер. Так, если в присутствии ГК и 10 мМ фосфата кривая зависимости активности синапсосомной глутаминазы от концентрации T_4 , T_3 и T_2 является сигмоидной, то в митохондриях эта зависимость имеет гиперболическую форму. Вместе с этим выяснилось, что кривая изменения активности фермента зависит не только от характера ТС, но и от концентрации фосфата. Оказалось, что с увеличением концентрации фосфата сигмоидная зависимость активности синапсосомной глутаминазы от концентрации T_4 , T_3 и T_2 переходит в гиперболическую (рис. 3, II).

Примечательно, что в митохондриях при наличии ГК даже самые высокие концентрации T_3 УК в сочетании с 10 мМ фосфата не приводят к снижению активности фермента, как это наблюдалось в опытах без ГК. Однако с повышением количества фосфата (20 мМ) даже при наличии ГК под действием T_3 УК активность митохондриального фермента падает. В аналогичных условиях активность синапсосомного фермента хотя и слабо, но продолжает расти.

Далее мы изучали действие ГК на активность глутаминазы этих фракций в зависимости от pH среды и характера применяемых активаторов.

Данные, представленные на рис. 4, а, б показывают, что при pH 8.0 активирующее влияние всех ТС под действием 20 мМ ГК полностью подавляется, в то время как при pH 9.0 в опытах с применением T_3 , T_2 и T_3 УК тормозящее действие ГК исчезает, а эффект T_4 усиливается почти вдвое. Интересно, что при более высоком значении pH (9.5) в присутствии ГК происходит значительное потенцирование эффекта всех испытанных гормонов. Между тем в аналогичных исследованиях, проведенных с фосфатом, наблюдается совершенно иная закономерность. В этом случае активирующее действие фосфата при любых значениях pH подавляется. Однако при pH 9.5 подавление активности фермента заметно уменьшается. В этой связи следует отметить, что в исследованиях, проведенных с аспаратом, N-ацетиласпаратом и сукцинатом, активность глутаминазы под действием ГК при любом значении pH подавляется одинаково сильно. Из результатов, приведенных на рис. 5, видно, что как в синапсосамах, так и митохондриях повышение концентрации ГК от 10 до 20 мМ приводит к заметному усилению стимулирующего эффекта ТС, а при применении более высокой концентрации ГК (40 мМ) эффект потенцирования не меняется. Между тем как даже при pH 9.5 с увеличением количества ГК активирующее действие фосфата еще сильнее подавляется.

Примечательно, что в исследованиях, проведенных с глутаминазой почек, было показано, что эффект ГК на стимулирующее действие ТС в зависимости от pH среды, а также при их совместном применении

с фосфатом подчиняется тем же закономерностям, которые наблюдались в аналогичных опытах, проведенных с глутаминазой мозга [21].

Необходимо указать, что, по мнению ряда авторов, ФЗГ мозга и почек представляют собой идентичные ферменты, обладающие одина-

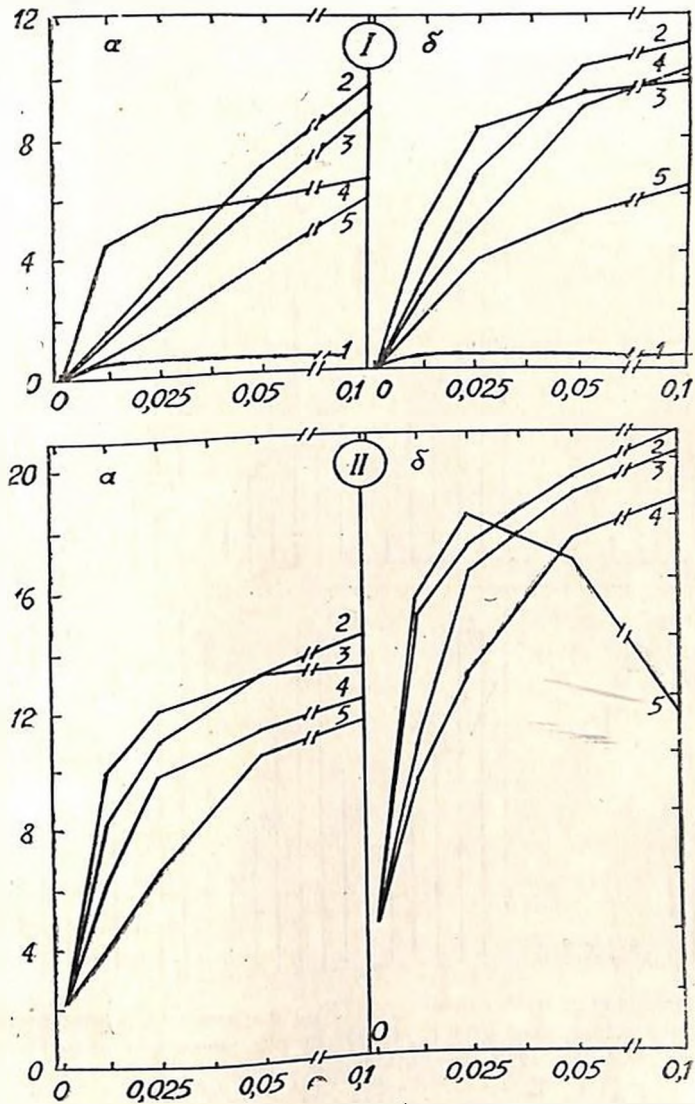


Рис. 3. Действие 20 мМ глутамата (ГК₂₀) на активность глутаминазы синапсом (а) и митохондрий (б) при сочетанном применении фосфата с различными концентрациями тиреоидных соединений (ТС), рН 8,0. I—ГК₂₀ + ТС + 10 мМ фосфата (Ф₁₀). II—ГК₂₀ + ТС + 20 мМ фосфата (Ф₂₀). 1—активность фермента в присутствии тиреоидных соединений и ГК₂₀ без фосфата; 2—Т₃ + ГК₂₀ + фосфат; 3—Т₄ + ГК₂₀ + фосфат; 4—Т₃УК + ГК₂₀ + фосфат; 5—Т₂ + ГК₂₀ + фосфат. По оси абсцисс—концентрация тиреоидных соединений, мМ; по оси ординат—активность фермента, мкмоль NH₃/мг белка. n=12.

ковыми физико-химическими и кинетическими свойствами [22—26]. Между тем на глутаминазу митохондриальной фракции селезенки ГК оказывает одностороннее действие независимо от характера применяемого модулятора [27].

На основании полученных данных можно прийти к выводу, что в зависимости от pH среды чувствительность глутаминазы мозга и почек к действию ГК претерпевает как количественные, так и качественные изменения. Заслуживает внимания то обстоятельство, что в присутствии ТС действие ГК на глутаминазу принципиально меняется. Эти данные дают нам право думать, что ТС и фосфат имеют различные регулятор-

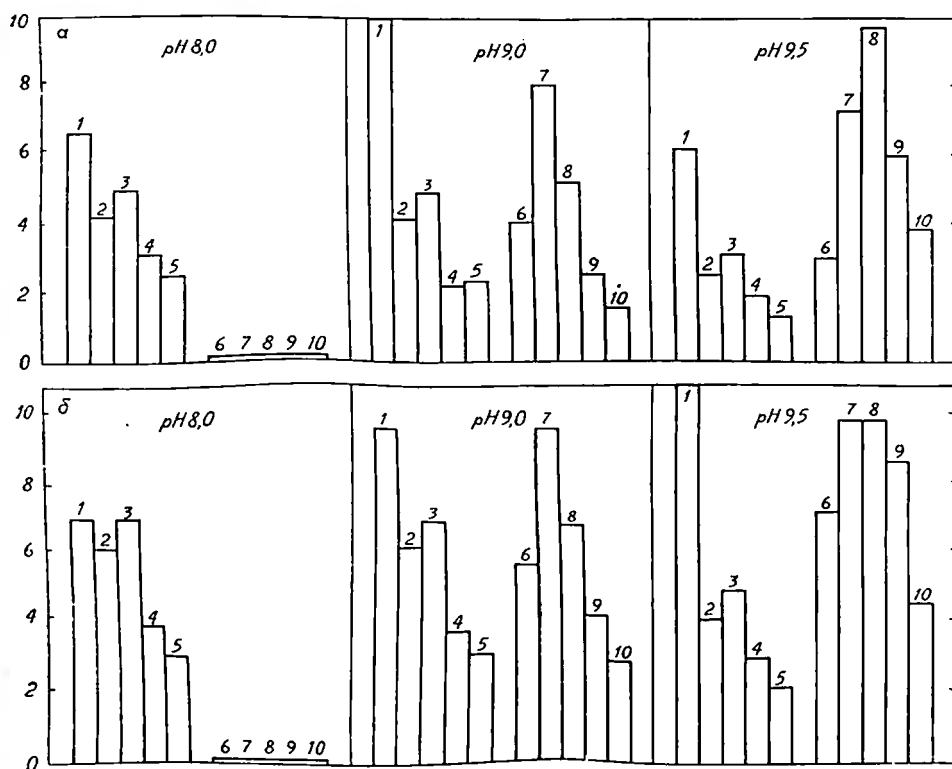


Рис. 4. Влияние 20 мМ глутамата (GK_{20}) на активность синантосомной (а) и митохондриальной (б) глутаминазы в зависимости от pH среды и различных ТС (0,1 мМ). 1—активность фермента в присутствии Φ_{10} ; 2— T_4 ; 3— T_3 ; 4— T_3UK ; 5— T_2 ; 6— $\Phi_{10} + GK_{20}$; 7— $T_4 + GK_{20}$; 8— $T_3 + GK_{20}$; 9— $T_3UK + GK_{20}$; 10— $T_2 + GK_{20}$. По оси абсцисс—pH среды; по оси ординат—активность фермента, $\mu\text{моль } NH_3/\text{мг белка}$. $n=12-14$

ные центры на поверхности молекулы фермента. Кроме того, из этих данных следует, что тормозящее действие ГК обусловлено не прямым перекрыванием каталитических или регуляторных центров глутаминазы, а опосредовано конформационными изменениями молекулы фермента.

Исследованиями Shapiro и соавт. было показано, что средство ГК и глутамин к глутаминназе почек регулируется концентрацией фосфата и с повышением его количества средство фермента к субстрату увеличивается, в то время как к ингибитору уменьшается. На основании данных изучения кинетики ингибирования глутаминназы почек ГК авторы приходят к заключению, что ГК является конкурентным ингибитором по отношению к субстрату и присоединяется к каталитическому центру фермента [28]. В связи с этим надо указать, что мягкая тепловая обработка ФЗГ мозга кролика приводит к заметному повышению каталитической актив-

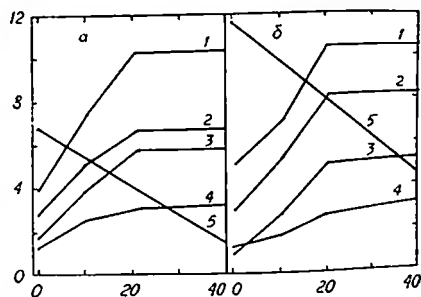


Рис. 5. Влияние различных концентраций глутамата (ГК) на активность глутаминназы синапсом (а) и митохондри (б), рН 9,5. 1— T_3 ; 2— T_4 ; 3— T_3UK ; 4— T_2 ; 5— Φ_{10} . По оси абсцисс—концентрация ГК, мМ; по оси ординат—активность фермента, $\mu\text{моль NH}_3/\text{мг белка}$. $n=8$

ности и полной денатурации фермента по отношению к тормозящему действию ГК при сохранении чувствительности к стимулирующему действию фосфата [10, 29]. Эти данные, а также тот факт, что при рН 9,5 ГК не только не подавляет, а напротив, значительно потенцирует эффект ТС, дают нам право прийти к заключению, что она является аллостерическим ингибитором ФЗГ мозга и почек, а, следовательно, ГК и глутамин не могут присоединиться к активному центру фермента, как считают Shapiro и соавт.

Известно, что в отсутствие фосфата глутаминназа существует в форме каталитически неактивного протомера, и активация этого фермента фосфатом сопровождается димеризацией его молекулы [30]. Между тем инактивация, вызванная ГК, обусловливается предотвращением этого процесса и образованием каталитически неактивных мономеров и только при наличии очень высоких концентраций фосфата ГК не может препятствовать полимеризации фермента, а следовательно, ингибировать его активность.

Надо полагать, что в наших опытах при применении низких концентраций фосфата и ТС, добавленных в отдельности, ГК также предотвращает агрегацию фермента, вследствие чего активность полностью подавляется. Однако при совместном применении этих же концентраций указанных эффекторов, по-видимому, происходят соответствующие конформационные изменения, вследствие которых наступает такая полимеризация фермента, при которой ГК не в состоянии предотвратить этот процесс.

Можно предположить, что изменение эффекта ГК в зависимости от рН среды обусловлено иным механизмом. Возможно, что только при наличии ТС повышение рН среды приводит к такому изменению агре-

гатного состояния фермента, при котором ГК не только не предотвращает, а напротив, способствует этому процессу. Для окончательного решения этого вопроса необходимы дополнительные исследования.

На основании проведенных опытов можно прийти к выводу, что синапсомная и митохондриальная глутамины по своим регуляторным свойствам не совсем идентичны. Однако в настоящее время трудно сказать, являются ли они разновидностями молекулярных форм, или одной и той же формой фермента, которая благодаря неодинаковому белковому и липидному окружению приобретает различные регуляторные свойства. В этой связи необходимо отметить, что кинетика активации растворимой глутамины печени фосфатом зависит от наличия фосфолипидов, выделенных из митохондриальных мембран [7].

Возбуждающее действие тиреоидных гормонов, играющих важную роль в регуляции активности синапсомной глутамины, на деятельность ЦНС, может быть отчасти обусловлено образованием нейромедиатора—ГК, вследствие усиления распада глутамин в глутаматергических нервных окончаниях.

REGULATORY PROPERTIES OF MEMBRANE FORM OF PHOSPHATE-DEPENDENT GLUTAMINASE OF SYNAPTOSOMES AND MITOCHONDRIA IN RAT BRAIN

HOVHANNISYAN V. S., AMBARTSUMYAN V. G., BEDJANIAN K. D.

Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of Arm. SSR, Yerevan

Thyroid hormones and their derivatives are effective activators of the membrane form of phosphate-dependent glutaminase of synaptosomes and mitochondria in rat brain. These hormones potentiate markedly the stimulating effect of inorganic phosphate on the enzyme activity in synaptosomes and mitochondria. However, high concentrations of 3,3',5-triiodothyroacetic acid sharply decrease the activity of mitochondrial enzyme only.

When all activators were added separately glutamate at low pH has a strong inhibitory effect. However in the case of simultaneous addition of phosphate and thyroid hormones the glutaminase activity is essentially increased and the inhibitory effect of glutamate is not observed. In the case of synaptosomal glutaminase the plot of activity versus thyroid hormones concentration is sigmoidal, in the case of mitochondrial enzyme—it's hyperbolic.

At high pH value glutamate also inhibits the stimulatory effect of phosphate, but potentiates the effect of thyroid hormones.

Data obtained show that the regulatory properties of synaptosomal and mitochondrial glutaminase, although having much in common, are not identical.

1. *Bradford H. F., Ward H. K., Thomes A. I. J. Neurochem.*, 30, 1453—1459, 1978.
2. *Hamberger A. C., Chiang G. H., Nylen E. S., Scheff S. W., Cotman C. W. Brain Res.*, 168, 513—530, 1979.
3. *Kvamme E., Olsen B. E. J. Neurochem.*, 36, 6, 1916—1923, 1981.
4. *Nimmo G. A., Tipton K. E. J. Neurochem.*, 33, 1083—1094, 1979.
5. *Kvamme E., Svenneby G. Res. Methods in Neurochem.*, 3, 277—290, 1975.
6. *Kvamme E., Torgner I. A. Biochem. J.*, 149, 83—91, 1975.
7. *McGivan J. D., Bradford N. M. Biochem. J.*, 214, 649—652, 1983.
8. *Оганесян В. С., Бадалян Л. Л., Микиртумова К. С., Саакян Ж. Дж. Вопросы биохимии мозга*, 8, 77—87, 1973.
9. *Оганесян В. С., Микиртумова К. С., Бунятян Г. Х. Вопросы биохимии мозга*, 12, 5—12, 1977.
10. *Оганесян В. С., Бунятян Г. Х., Микиртумова К. С., Бадалян Л. Л. Вопросы биохимии мозга*, 6, 5—13, 1970.
11. *Оганесян В. С., Бадалян Л. Л., Бунятян Г. Х. Докл. АН АрмССР*, 69, 4, 243—245, 1979.
12. *Бадалян Л. Л., Оганесян В. С. Биол. журн. Армении*, 35, 1, 29—36, 1982.
13. *Саакян Ж. Дж., Беджаниян К. Д., Бадалян Л. Л., Оганесян В. С. Тезисы научных сообщений IX всесоюзной конференции по биохимии нервной системы*, 83—84, Ереван, 1983.
14. *Палладин А. В., Курсенко О. Б. Биохимия*, 26, 2, 385—390, 1961.
15. *Whittaker V. P., Barker L. A. Methods of Neurochem.*, 2, 1—52, 1972.
16. *Lowry O. H., Rosenbrough N. T., Farr A. L., Randall R. G. J. Biol. Chem.*, 193, 265—275, 1951.
17. *Силакова А. И., Труш Г. П., Являкова А. Вопр. мед. химии*, 5, 8, 538—545, 1962.
18. *Оганесян В. С. Докл. АН АрмССР*, 48, 171, 1969.
19. *Katunuma N., Hirino A., Tomino J. Adv. Enzyme Regul.*, 5, 55, 1967.
20. *Бадалян Л. Л., Бунятян Г. Х., Оганесян В. С. Вопросы биохимии мозга*, 10, 40—53, 1975.
21. *Саакян Ж. Дж., Оганесян В. С. Биол. журн. Армении*, 1985 (в печати).
22. *Svenneby G. J. Neurochem.*, 18, 2201, 1971.
23. *Svenneby G. J. Neurochem.*, 19, 165, 1972.
24. *Kvamme E., Tveit B., Svenneby G. J. Biol. Chem.*, 245, 1871—1877, 1970.
25. *Tveit B., Svenneby G., Kvamme E. Eur. J. Biochem.*, 14, 337—344, 1970.
26. *Curthoys N. P., Kuhlenschmidt T., Godfrey S. S., Weiss R. F. Arch. Biochem. and Biophys.*, 172, 162—168, 1976.
27. *Оганесян В. С., Саакян Ж. Дж., Айрапетян Р. Л. Биол. журн. Армении*, 33, 9, 932—940, 1980.
28. *Shapiro R. A., Morehouse R. F., Curthoys N. P. Biochem. J.*, 207, 561—566, 1982.
29. *Оганесян В. С., Бунятян Г. Х., Саакян Ж. Дж. Вопросы биохимии мозга*, 7, 18—29, 1972.
30. *Godfrey S., Kuhlenschmidt T., Curthoys N. P. J. Biol. Chem.*, 252, 1927—1951, 1977.

Поступила 18. V 1984