



УДК 577.151:642

КООРДИНИРОВАНИЕ ДЕЙСТВИЯ МОДУЛЯТОРОВ
РАСТВОРИМОЙ ФОСФАТЗАВИСИМОЙ ГЛУТАМИНАЗЫ
МОЗГА ТРИЙОДО-L-ТИРОНИНОМ

ОГАНЕСЯН В. С., БАДАЛЯН А. А., БЕДЖАНЯН К. Д.

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

Установлено, что в присутствии трийодо-L-тиронина, фосфата и какого-нибудь третьего модулятора—цитрата, сукцината, аспартата или ацетиласпартата активность растворимой глутаминазы мозга сильно повышается. Любое другое тройное сочетание модуляторов либо вовсе не повышает активность фермента, либо повышает незначительно. При сочетанном применении 4-х различных модуляторов с обязательным наличием в среде фосфата и трийодо-L-тиронина эффективность действия двух других модуляторов зависит от характера взаимоотношений между ними и каждому модулятору принадлежит определенное место в этом сложном процессе.

Деамидирование глутаминна в мозговой ткани, осуществляемое фосфатзависимой глутаминазой (ФЗГ), активируется целым рядом соединений физиологической природы и носит сложный и поливалентный характер [1—5]. Регуляторные свойства мембраносвязанной (МСГ) и растворимой (РГ) форм ФЗГ во многом принципиально отличаются [6—9]. Среди множества эффекторов этих молекулярных форм фермента особое место занимают тиреоидные гормоны (ТГ) [2, 9—11]. Как тироксин (T_4), так и трийодо-L-тиронин (T_3), добавленные в отдельности, практически не стимулируют активность РГ мозга, хотя и являются эффективными аллостерическими активаторами МСГ [8, 9]. Цитрат, сукцинат, малеат и другие эффекторы МСГ также не влияют на активность РГ. Однако сочетанное применение фосфата, единственного эффективного активатора РГ, цитрата, сукцината, аспартата (АК) и других соединений с T_3 приводит к многократному повышению активности фермента [9]. Следует отметить, что в этой сложной системе, обеспечивающей регуляцию глутаминазы, первостепенное значение приобретает характер взаимоотношений различных модуляторов.

Задачей настоящего исследования явились поиски условий для эффективного стимулирования активности РГ, выяснение индивидуальных особенностей действия отдельных модуляторов и их взаимоотношений, а также места и значения каждого эффектора в общей системе регуляции этого фермента.

Материалы и методы

Митохондриальную фракцию, выделенную из коры мозга беспородных крыс массой 150—200 г по ранее описанной методике [12], промывали в ледяной бидистиллированной воде и центрифугировали при 17000 г в течение 20 мин. Полученный осадок суспендировали в воде, затем подвергали 6-кратному замораживанию-размораживанию. Взвесь митохондриальной фракции можно хранить при -20° в течение нескольких суток. Размороженную митохондриальную фракцию центрифугировали при 20000 г в течение 70 мин. Полученную таким путем прозрачную, слегка опалесцирующую надосадочную жидкость использовали в качестве источника РГ.

Инкубационная смесь в объеме 1,5 мл содержала 0,4 мл ферментного препарата (около 400 мкг белка); 0,5 мл 0,2 М трис-НСI буфера pH 8,0; 20 мМ L-глутамин и, в зависимости от поставленной задачи, различные активаторы в следующих концентрациях: фосфат—10 мМ, АТР—10 мМ, цитрат, сукцинат, ацетиласпартат (ААК) и АК—по 50 мМ. Растворы этих соединений дозодили NaOH до соответствующего pH. Концентрации тиреоидных соединений— T_1 («Reanal», Венгрия), T_3 («Koch-Light», Англия), диiodo-L-тиронина (T_2) («Sigma», США), 3, 3', 5-триiodоти-реоуксусной кислоты (T_2 -УК) («Sigma», США) в опытах варьировали от 0,001 до 0,04 мМ. Гормональные препараты растворяли добавлением 0,01 н. NaOH (pH 10,0). Реакционную смесь инкубировали 30 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 микродиффузионным методом [13]. Количество белка в пробах определяли по методу Lowry и соавт. [14].

Результаты и обсуждение

Как было отмечено выше, T_3 многократно усиливает действие различных модуляторов на активность РГ, однако для проявления эффекта потенцирования необходимы его относительно высокие концентрации (0,02—0,05 мМ). Для выявления условий, при которых действие T_3 проявлялось бы и при применении его низких концентраций, мы изучали влияние трех различных эффекторов на глутаминазу—низких концентраций T_3 фосфата и какого-либо третьего модулятора.

Как показывают данные, представленные на рис. 1, а, при применении каждого эффектора в отдельности только в присутствии фосфата (10 мМ) наблюдается повышение активности фермента. При сочетании применения фосфата с цитратом, сукцинатом, АК или ААК происходит слабое потенцирование их действия (начальные точки кривых, рис. 1, а), а в случае сочетания этих соединений с T_3 потенцирования практически не наблюдается. В то же время в присутствии 0,005 мМ T_3 одновременное применение фосфата с третьим ингредиентом уже приводит к значительному повышению активности глутаминазы, а при концентрации гормо-

на—0,01 мМ активность фермента многократно возрастает. Среди модуляторов, применяемых в качестве третьего ингредиента, наиболее эффективным оказался цитрат.

В настоящее время известен целый ряд низкомолекулярных соединений различной природы, эффективно стимулирующих активность МСГ мозга и почек [15—17]. Среди фосфоорганических соединений АТР является одним из эффективных стимуляторов глутаминазы мозга. Следующая серия опытов проводилась с АТР с целью выяснения его взаимоотношений с гормонами и другими эффекторами.

Данные, представленные на рис. 1, б, показывают, что АТР, добавленный в концентрации 10 мМ, стимулирует активность РГ примерно так же, как и P_1 . Его сочетание с цитратом, сукцинатом, АК или ААК приводит к незначительному повышению активности фермента. В присутствии 0,001 мМ T_3 усиления стимулирующего влияния АТР не происходит, между тем как добавление третьего модулятора приводит к заметному повышению активности глутаминазы. Многократное усиление её активности наблюдается в случае применения 0,02 мМ T_3 . В опытах с АТР модуляторы, испытанные в качестве третьего ингредиента, почти одинаково эффективны. Из этих данных следует, что для РГ P_1 является более эффективным модулятором, чем АТР.

Необходимо отметить, что, в отличие от T_3 , сочетания достаточно высоких концентраций T_4 с другими модуляторами не приводят к сколько-нибудь заметному стимулированию активности РГ [9]. Было интересно изучить действие T_4 на фермент при тройных сочетаниях модуляторов. Как выяснилось из проведенных исследований, сочетания T_4 фосфата и третьего модулятора приводят к повышению активности глутаминазы (рис. 1, в). Однако даже при применении относительно высоких концентраций T_4 его эффект, по сравнению с эффектом T_3 , выражен намного слабее.

Данные, приведенные на рис. 2, а, показывают, что в присутствии T_2 и фосфата действие других модуляторов также усиливается и что для стимулирования активности фермента и в этом случае необходимы высокие концентрации T_2 . Эффекты сукцината, АК и ААК в присутствии T_2 и фосфата усиливаются примерно в той же степени, что и в опытах с T_4 , а действие цитрата при применении с T_2 выражено заметно сильнее. Из полученных данных следует, что эффективность гормона зависит от количества атомов йода в его молекуле—как увеличение, так и уменьшение на атом йода в молекуле T_3 приводит к значительному снижению его стимулирующего действия на фермент. Наряду с этим выяснилось, что изменения в структуре боковой цепи T_3 также отражаются на его эффективности. Из результатов, приведенных на рис. 2, б, видно, что в присутствии фосфата применение T_3 УК с этими эффекторами активизирует глутаминазу сильнее, чем T_4 и T_2 , но по сравнению с действием T_3 оно выражено слабее. Необходимо отметить, что трийодо-d-тиронин, в отличие от трийодо-L-тиронина, вообще не действует на глутаминазу.

Таким образом, сочетания любого модулятора с низкими концентра-

циями T_3 не приводят к повышению активности глутаминазы, и в этих условиях для стимулирования активности необходимо наличие трех модуляторов— T_3 , фосфата и какого-либо третьего эффектора. В связи с этим возникает вопрос, могут ли сочетания двух других модуляторов с низкими концентрациями T_3 повышать активность глутаминазы, или же наличие фосфата, как третьего ингредиента реакционной смеси, обязательно. В следующей серии опытов мы изучали активность РГ при одновременном добавлении T_3 , цитрата и третьего модулятора. Как видно из

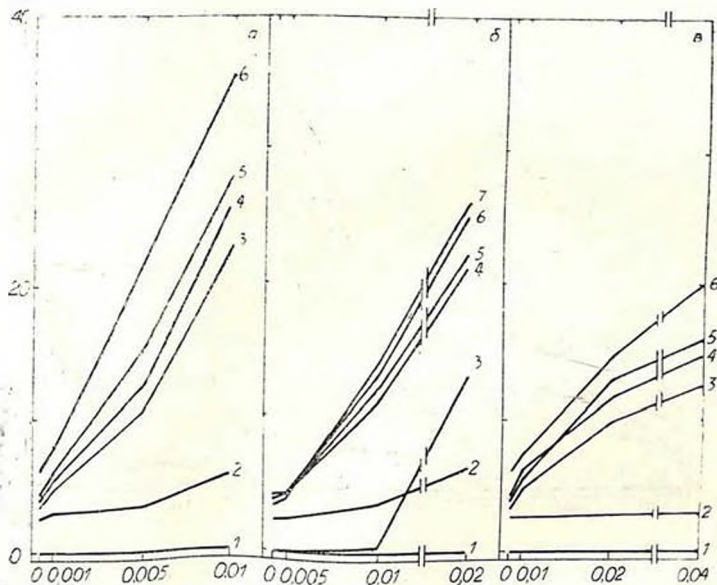


Рис. 1. Действие T_3 и T_4 на активность РГ мозга при применении различных сочетаний модуляторов: а—активность фермента в присутствии фосфата и T_3 : 1— T_3 +модулятор; 2— T_3 +фосфат; 3— T_3 +фосфат+ААК; 4— T_3 +фосфат+АК; 5— T_3 +фосфат+сукцинат; 6— T_3 +фосфат+цитрат; б—активность фермента в присутствии АТР и T_3 : 1— T_3 +модулятор; 2— T_3 +АТР; 3— T_3 +цитрат; 4— T_3 +АТР+ААК; 5— T_3 +АТР+АК; 6— T_3 +АТР+цитрат; 7— T_3 +АТР+сукцинат. в—активность фермента в присутствии фосфата и T_4 : 1— T_4 +модулятор; 2— T_4 +фосфат; 3— T_4 +фосфат+ААК; 4— T_4 +фосфат+АК; 5— T_4 +фосфат+сукцинат; 6— T_4 +фосфат+цитрат. По оси абсцисс—концентрация тиреоидных соединений; по оси ординат—активность фермента, мкмоль NH_3 /мг белка, $n=10-12$

данных, приведенных на рис. 2, в, при сочетанном применении сукцината, АК или ААК с цитратом и с T_3 активность глутаминазы практически не меняется и только в присутствии относительно высоких концентраций T_3

и цитрата происходит повышение активности фермента. Оказалось, что и в этих условиях добавление третьего ингредиента совместно с цитратом и T_3 не приводит к сколько-нибудь заметному изменению его активности. Надо отметить, что сочетание применение $AK + AAK$, $AK +$ сукцинат и $AAK +$ сукцинат с T_3 не приводит к повышению активности фермента.

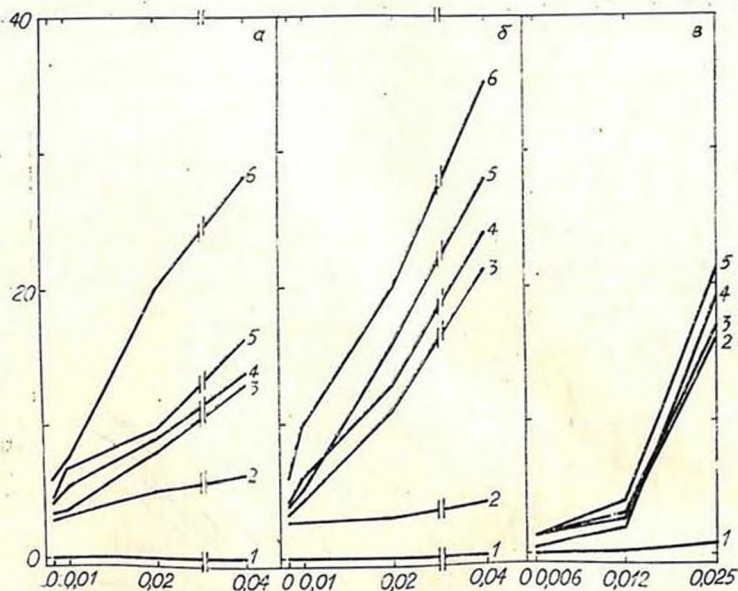


Рис. 2. Действие T_2 , T_3UK и T_3 на активность РГ мозга при применении различных сочетаний модуляторов. а) активность фермента в присутствии фосфата и T_2 : 1— T_2 +модулятор; 2— T_2 +фосфат; 3— T_2 +фосфат+ AAK ; 4— T_2 +фосфат+ AK ; 5— T_2 +фосфат+сукцинат; 6— T_2 +фосфат+цитрат. б) активность фермента в присутствии фосфата и T_3UK . 1— T_3UK +модулятор; 2— T_3UK +фосфат; 3— T_3UK +фосфат+ AAK ; 4— T_3UK +фосфат+ AK ; 5— T_3UK +фосфат+сукцинат; 6— T_3UK +фосфат+цитрат. в) активность фермента в присутствии цитрата и T_3 : 1— T_3 +модулятор; 2— T_3 +цитрат+ AAK ; 3— T_3 +цитрат+сукцинат; 4— T_3 +цитрат; 5— T_3 +цитрат+ AK . По оси абсцисс—концентрация тиреоидных соединений; по оси ординат—активность фермента, мкмоль NH_3 /мг белка, $n=10-12$

Итак, выяснилось, что в регуляции активности РГ важное значение имеют определенные сочетания модуляторов и не всякие тройные сочетания повышают активность фермента. Конечно, трудно сказать, сколько эффекторов участвуют в регуляции активности РГ в нервной клетке и какие возможные их сочетания чаще всего могут возникать. Тем не менее, надо полагать, что наиболее вероятный вариант—это одновременное уча-

ствие нескольких эффекторов в этом процессе. Однако следует отметить, что концентрация цитрата, сукцината, АК и ААК в клетке заметно ниже той, которая применялась в наших опытах. В связи с этим возникла необходимость выяснить, могут ли низкие концентрации этих модуляторов, добавленных одновременно, иметь такой же эффект, как высокая концентрация одного из них и какие взаимоотношения могут возникать между ними при применении более трех эффекторов.

Таблица

Влияние различных сочетаний модуляторов на активность растворимой фосфатзависимой глутаминазы мозга крыс (мкмоль $\text{NH}_3/\text{мг}$ белка)

Модуляторы, мМ		3, 3', 5-трийодо-L-тиронин, 0,01 мМ	Фосфат (10 мМ)	Фосфат (10 мМ)+ 3, 3', 5-трийодо-L-тиронин (0,01 мМ)
		0 (5)	2,8±0,1 (8)	4,9±0,3 (8)
Цитрат	10	0 (4)	3,8±0,3 (8)	15,0±0,9 (8)
	20	0 (4)	4,6±0,3 (8)	22,3±1,8 (8)
Сукцинат	10	0 (4)	3,0±0,2 (8)	9,3±0,8 (8)
	20	0 (4)	3,2±0,2 (8)	12,8±1,3 (8)
Аспартат	10	0 (4)	2,8±0,2 (6)	7,2±0,7 (6)
	20	0 (4)	2,9±0,2 (6)	10,0±1,2 (6)
Ацетиласпартат	10	0 (3)	2,8±0,2 (5)	8,80±0,96 (5)
	20	0 (3)	2,8±0,2 (5)	10,60±0,98 (5)
Цитрат+аспартат+сукци- нат+ацетиласпартат (по 10)		0,4 (5)	5,4±0,6 (5)	30,0±4,1 (5)
Цитрат+ацетиласпартат (по 10)		0 (4)	4,1±0,4 (6)	22,8±2,4 (6)
Цитрат+аспартат (по 10)		0 (3)	4,0±0,4 (6)	22,2±2,1 (6)
Цитрат+сукцинат (по 10)		0 (3)	4,2±0,4 (6)	21,4±2,3 (6)
Сукцинат+аспартат (по 10)		0 (3)	3,6±0,4 (6)	15,1±1,6 (6)
Аспартат+ацетиласпартат (по 10)		0 (3)	3,4±0,4 (6)	15,0±1,7 (6)
Сукцинат+ацетиласпартат (по 10)		0 (3)	3,5±0,3 (6)	14,2±2,3 (6)

Данные, приведенные в таблице, показывают, что в присутствии фосфата (10 мМ), T_3 (0,01 мМ) и четырех различных модуляторов с низкой концентрацией (10 мМ) происходит значительное повышение активности глутаминазы, между тем как в присутствии только фосфата они незначительно активируют фермент и никакого эффекта не оказывают при их сов-

местном добавлении с T_3 . Вместе с тем выяснилось, что при применении низких концентраций одного из этих модуляторов с фосфатом и T_3 сильнее всего активность глутаминазы повышается в присутствии цитрата, и лишь незначительно в присутствии АК стимулируется её активность. Однако из приведенных данных примечательным является то, что при сочетанном применении 10 мМ цитрата с 10 мМ АК, ААК или сукцината происходит потенцирование их действия и активность фермента достигает уровня, который наблюдается при применении 20 мМ цитрата. При сочетании применения 10 мМ сукцината с такой же концентрацией АК или ААК, или же ААК с АК активность фермента стимулируется более эффективно, чем при применении двойной концентрации одного из этих соединений. Полученные данные показывают, что в присутствии T_3 и фосфата из всех изученных сочетаний наиболее эффективно на активность глутаминазы действует совместное применение цитрата с каким-нибудь третьим модулятором. При этом действие как самого неэффективного (АК), так и остальных модуляторов усиливается в одинаковой степени. Из этих данных явствует, что в регуляции активности РГ не столь важна абсолютная концентрация отдельных эффекторов, сколь их удачное сочетание.

На основании полученных результатов можно прийти к выводу, что среди множества модуляторов, участвующих в регуляции активности РГ мозга, особое место занимают T_3 и фосфат. В этом процессе важное значение имеет характер взаимоотношений модуляторов, который зависит от их индивидуальных свойств и определяет место и значение каждого из них в этой сложной системе модуляторов.

Трудно сказать, какой именно из вышеописанных способов активации РГ имеет наибольшее значение, но сам факт наличия нескольких способов регуляции свидетельствует о важной роли глутаминазы в жизнедеятельности нервной клетки.

THE ROLE OF TRIIDO-L-TYRONINE IN COORDINATION OF MODULATORS OF THE SOLUBLE PHOSPHATE DEPENDENT BRAIN GLUTAMINASE

V. S. OGANESYAN, L. L. BADALYAN, and K. D. BEDZHANYAN

Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the Armenian SSR, Yerevan

The activity of soluble brain glutaminase greatly increases in the presence of triido-L-tyrosine, phosphate and a «third» modulator such as citrate, succinate, aspartate or acetyl aspartate. Any other triple combination of modulators either does not increase the enzyme activity or shows only insignificant stimulation. When four different modulators are used in combination, provided phosphate and triido-L-tyrosine are present in the medium, the efficacy of two other modulators depends on interrelations between them and every modulator plays a certain role in this complex process.

ЛИТЕРАТУРА

1. Оганесян В. С., Бунятыан Г. Х., Микиртумова К. С., Бадалян Л. А. *Вопр. биохимии мозга*, т. 5, с. 5—16, Ереван, Изд-во АН АрмССР, 1969.
2. Оганесян В. С., Бунятыан Г. Х., Бадалян Л. А., Микиртумова К. С. *Вопр. биохимии мозга*, т. 6, с. 5—13, Ереван, Изд-во АН АрмССР, 1970.
3. Svenneby G. J. *Neurochem.*, v. 18, p. 2201—2208, 1971.
4. Kvamme E., Torgner A. *Biochem. J.*, v. 149, p. 83—91, 1975.
5. Weil-Malherbe H. J. *Neurochem.*, v. 16, p. 855—864, 1969.
6. Nimmo G., Tipton K. F. *Biochem Pharmacol.*, v. 30, p. 1635—1641, 1981.
7. Nimmo G., Tipton K. F. *Eur. J. Biochem.*, v. 117, p. 57—64, 1981.
8. Оганесян В. С., Амбарцумян В. Г., Беджанян К. Д. *Нейрохимия*, т. 3, с. 372—381, 1984.
9. Беджанян К. Д., Бадалян Л. А., Оганесян В. С. *Нейрохимия*, т. 4, с. 379—387, 1985.
10. Бадалян Л. А., Бунятыан Г. Х., Оганесян В. С. *Вопр. биохимии мозга*, т. 10, с. 40—54, Ереван, Изд-во АН АрмССР, 1975.
11. Оганесян В. С., Бадалян Л. А., Микиртумова К. С., Саакян Ж. Дж. *Вопр. биохимии мозга*, т. 8, с. 77—90, Ереван, Изд-во АН АрмССР, 1974.
12. Палладин А. В., Кирсенко О. Б. *Биохимия*, т. 26, с. 385—390, 1961.
13. Силакова А. И., Труш Г. П., Являкова А. *Вопр. мед. химии*, т. 5, с. 538—545, 1962.
14. Lowry O. H., Rosenbrough N. T., Farr A. L., Randall R. G. *J. Biol. Chem.*, v. 193, p. 265—275, 1951.
15. Оганесян В. С., Саакян Ж. Дж., Айрапетян Р. А., Бунятыан Г. Х. *Биол. журн. Армении*, № 33, с. 932—940, 1980.
16. Weil-Malherbe H. J. *Neurochem.*, v. 19, p. 2257—2267, 1972.

Поступила 7 VI 1988