

РАСТВОРИМАЯ ФОСФАТЗАВИСИМАЯ ГЛУТАМИНАЗА  
МОЗГА КРЫС И РОЛЬ РАЗЛИЧНЫХ МОДУЛЯТОРОВ  
В РЕГУЛЯЦИИ ЕЁ АКТИВНОСТИ

БЕДЖАНИЯ К. Д., БАДАЛЯН Л. Л., ОГАНЕСЯН В. С.

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

Установлено, что среди множества испытанных соединений единственным эффективным активатором растворимой фосфатзависимой глутаминазы (ФЗГ) мозга является фосфат. Стимулирующий эффект малеата (МТ), цитрата (ЦТ) и 3,3',5-трийодо-L-тиронина ( $T_3$ ) составляет соответственно 5,4 и 1,3% от эффекта фосфата. Действие тироксина ( $T_4$ ) выражено еще слабее. Сукцинат (СТ),  $\alpha$ -кетоглутарат (КГ), N-ацетил-L-аспартат (ААК) и L-аспартат (АК), а также 3,5-дйодо-L-тиронин ( $T_2$ ) и 3,3',5-трийодотиреоуксусная кислота ( $T_3$ УК) практически не стимулируют активность растворимого фермента. Однако в присутствии тиреоидных соединений (ТС) действие фосфата и других модуляторов значительно усиливается. Наиболее эффективным в этом отношении является  $T_3$ . В его присутствии эффект низких концентраций фосфата усиливается более чем в 10 раз, а остальных модуляторов — в несколько десятков раз.  $T_4$ , в отличие от других ТС, в этих условиях оказался совершенно не эффективным. При совместном применении фосфата с ЦТ, СТ, КГ, ААК и АК также наблюдается усиление их действия, но не более, чем в 3 раза. Однако любые другие сочетания испытанных модуляторов без участия фосфата или ТС не приводят к повышению активности растворимой глутаминазы. Полученные данные показывают, что растворимая глутаминаза мозга по своим регуляторным свойствам во многом принципиально отличается от её мембраносвязанной формы.

Сравнительно недавно работами английских исследователей было показано, что в митохондриальной фракции мозга свиньи, наряду с мембраносвязанной глутаминазой, содержится и легко экстрагируемая растворимая форма фермента [1]. Имея одинаковую субклеточную локализацию, они отличаются некоторыми регуляторными и кинетическими свойствами. Мембраносвязанная глутаминаза более чувствительна к низким концентрациям фосфата, чем растворимая и, если активированная фосфатом растворимой глутаминазы связано с её агрегацией, то мембраносвязанная глутаминаза не подчиняется этой закономерности. Показаны значительные отличия и в кинетике ингибирования глутаматом [2—4].

Следует отметить, что тиреоидные гормоны (ТГ), являясь эффективными аллостерическими активаторами ФЗГ, занимают особое место в регуляции активности её мембраносвязанной формы митохон-

дриальной фракции мозга и почек [5—9]. Вместе с этим установлено, что в митохондриях коркового слоя почек крыс также содержится растворимая глутаминаза и регуляция её активности ТГ во многом принципиально отличается от таковой мембраносвязанной формы фермента [10—12]. Однако роль ТГ, а также их возможных взаимоотношений с другими модуляторами в процессе регуляции активности растворимой глутаминазы мозга не изучена. Целью данной работы было изучение этого вопроса.

### Материалы и методы

Митохондриальную фракцию, выделенную из коры мозга беспородных крыс массой 150—200 г по ранее описанной методике [13], промывали в ледяной дистиллированной воде и центрифугировали при 17000g в течение 20 мин. Полученный осадок суспендировали в воде, затем подвергали 6-кратному замораживанию-размораживанию и оставляли в замороженном состоянии в течение 20 ч при -20°. На следующий день размороженную митохондриальную фракцию центрифугировали 2 раза при 20000g: сначала в течение 40 мин, затем брали супернатант и центрифугировали ещё 20 мин. Полученную таким путем прозрачную, слегка опалесцирующую надосадочную жидкость использовали в качестве источника растворимой глутаминазы.

Инкубационная смесь в объеме 1,5 мл содержала 0,4 мл ферментного препарата (0,4—0,55 мг белка); 0,5 мл 0,2 М трис-НСI буфера рН 8,0; 20 мМ L-глутамина и, в зависимости от поставленной задачи, различные активаторы в следующих концентрациях: фосфат—6,25, 12,5 и 25 мМ, ЦТ, МТ, СТ, КГ, ААК и АК—по 50 мМ. Растворы этих соединений доводили NaOH до соответствующего рН. Концентрации ТС—Т<sub>4</sub> («Reanal», Венгрия), Т<sub>3</sub> («Koch-Lights», Англия), Т<sub>2</sub> («Sigma», США), Т<sub>3</sub>УК («Sigma», США) в опытах варьировали от 0,0125 до 0,1 мМ. Гормональные препараты растворяли добавлением 0,01 н. NaOH (рН 10). Реакционную смесь инкубировали 30 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 [14]. Количество белка в пробах определяли по методу Lowry и соавт. [15].

### Результаты и обсуждение

Необходимо отметить, что полученная нами растворимая глутаминаза мозга обладает чрезвычайно низкой каталитической активностью, которая в отсутствие эффекторов не поддается определению. В связи с этим в первой серии опытов изучали влияние различных соединений на активность растворимой глутаминазы при различном рН среды. Среди испытанных модуляторов единственным эффективным активатором этой глутаминазы является фосфат (рис. 1). Максимальное повышение активности фермента в присутствии фосфата происходит при рН 8,5. Стимулирующее действие ЦТ и МТ на растворимую глутаминазу составляет примерно 4—5% от эффекта фосфата, а СТ, КГ, ААК и АК, Т<sub>2</sub> и Т<sub>3</sub>УК практически не стимулируют активность фермента. Эффект Т<sub>3</sub> составляет немногим более 1% от эффекта фосфата. Ещё меньше выражено действие Т<sub>4</sub>. В связи с приведенными данными интересно отметить, что ТГ и другие соединения являются эффективными активаторами мембраносвязанной глутаминазы мозга [7, 16].

В следующей серии опытов изучали влияние фосфата на активность растворимой глутаминазы мозга в присутствии ТС, учитывая то обстоятельство, что их совместное применение значительно стимулирует активность мембраносвязанной формы фермента [8].

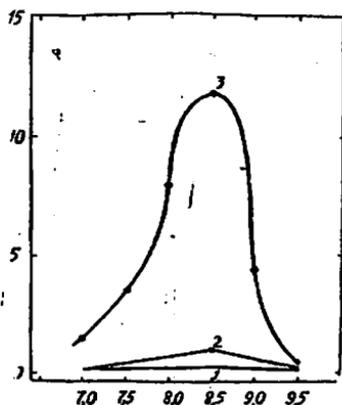


Рис. 1. Влияние различных эффекторов на активность растворимой глутаминазы мозга крысы в зависимости от pH среды. 1—активность фермента в присутствии  $T_3$  (0,1 мМ); 2—МТ; ЦТ (50 мМ); 3— $P_1$  (25 мМ). По оси абсцисс—значение pH среды; по оси ординат—активность фермента, мкмоль  $NH_3$ /мг белка.  $n = 8-10$

Как показывают данные, представленные на рис. 2, все испытанные ТС потенцируют стимулирующее действие фосфата. Однако потенцирование происходит в различной степени и зависит как от природы применяемого гормона, так и от концентрации фосфата. При одновременном применении 25 мМ фосфата с высокими концентрациями  $T_3$  и  $T_3УК$  происходит примерно 6-кратное усиление действия фосфата, а в аналогичных опытах с  $T_4$  и  $T_2$  эффект фосфата усиливается соответственно в 3 и 2,5 раза. Во всех случаях предельное повышение активности фермента наступает при концентрации ТС, равной 0,05 мМ. Повышение концентраций  $T_3$ ,  $T_3УК$ ,  $T_2$  и  $T_4$  до 0,1 мМ не приводит к заметным изменениям уровня активности фермента. Однако при уменьшении концентрации фосфата, потенцирование его действия в случае применения  $T_3$  сильно возрастает. Так, эффект 12,5 и 6,25 мМ фосфата усиливается соответственно в 12—17 раз, между тем как в опытах с  $T_3УК$  и  $T_2$  стимулирующее действие этих же концентраций фосфата усиливается всего лишь в 3—4 раза. При применении низких концентраций фосфата потенцирование его эффекта в присутствии  $T_4$  полностью исчезает. В этой связи необходимо отметить, что и  $T_4$ , и  $T_3$  примерно одинаково потенцируют стимулирующее действие фосфата на мембраносвязанную глутаминазу митохондрий и синапсом мозга, а повышение активности фермента в этом случае происходит не более, чем в 3 раза. Иначе проявляется и действие  $T_3УК$  на активность этих форм фермента [8]. Если с повышением концентрации  $T_3УК$  активность мембраносвязанной глутаминазы митохондрий, стимулируемая фосфатом, резко падает, а эффект потенцирования полностью исчезает, то активность растворимой глутаминазы в этих же условиях несколько возрастает.

Далее исследовали влияние ЦТ, МТ, СТ, КГ, ААК и АК на активность растворимой глутаминазы мозга в присутствии различных ТС. Начальные точки на кривых, представленных на рис. 3, показывают, что при рН 8,0 СТ, ААК, АК и КГ (50 мМ), также как и ТС, добавленные в отдельности, почти не активируют растворимую глутаминазу. Несмотря на это, при одновременном добавлении указанных модуляторов с  $T_3$  и его производными активность фермента сильно возрастает. Как видно, степень активирования фермента зависит не только от при-

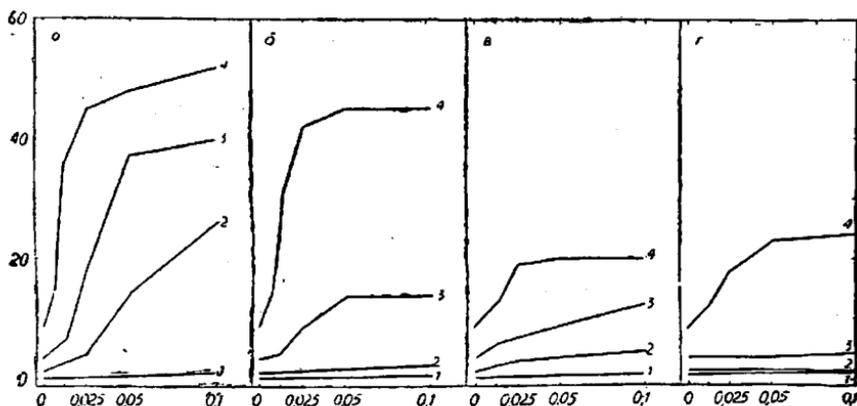


Рис. 2. Действие фосфата на активность растворимой глутаминазы мозга крыс в присутствии различных тиреоидных соединений (ТС) (рН 8,0). а—активность фермента в присутствии  $T_3$ ; б— $T_3$ УК; в— $T_2$ ; г— $T_4$ . 1—ТС; 2—ТС + 6,25 мМ  $P_1$ ; 3—ТС + 12,5 мМ  $P_1$ ; 4—ТС + 25 мМ  $P_1$ . По оси абсцисс—концентрация тиреоидных соединений; по оси ординат—активность фермента, мкмоль  $NH_3$ /мг белка,  $n=10-12$ .

роды ТС, но и от характера применяемого модулятора. Так, в присутствии  $T_3$ ,  $T_3$ УК и  $T_2$  глутаминазная активность, стимулируемая МТ и ЦТ, повышается значительно сильнее, чем в случае применения СТ, ААК, АК и КГ, а наиболее эффективным среди гормональных препаратов, также как и в опытах с фосфатом, является  $T_3$ . В его присутствии эффект МТ и ЦТ и остальных модуляторов возрастает в несколько десятков раз. Их действие в присутствии  $T_3$ УК выражено сильнее, чем при сочетанном применении с  $T_2$ .

Однако, как выяснилось, из всех испытанных ТС исключение в этом отношении составляют только  $T_4$ . При любых сочетаниях  $T_4$  с указанными модуляторами не происходит сколько-нибудь заметного повышения активности глутаминазы. Этот факт заслуживает внимания в связи с тем, что  $T_4$  и  $T_3$  в одинаковой степени усиливают эффект указанных соединений на мембраносвязанную глутаминазу мозга, а её активность в этом случае повышается не более чем в 3—4 раза (неопубликованные данные). Кроме того, было показано, что в присутствии ТС действие ЦТ и МТ на мембраносвязанную глутаминазу потенцируется не сильнее, чем действие СТ, КГ, ААК и АК.

Таким образом, можно прийти к заключению, что по своим регуляторным свойствам растворимая глутаминназа во многом принципиально отличается от её мембраносвязанной формы, и это отличие, в основном, обусловлено особенностями действия ТС.

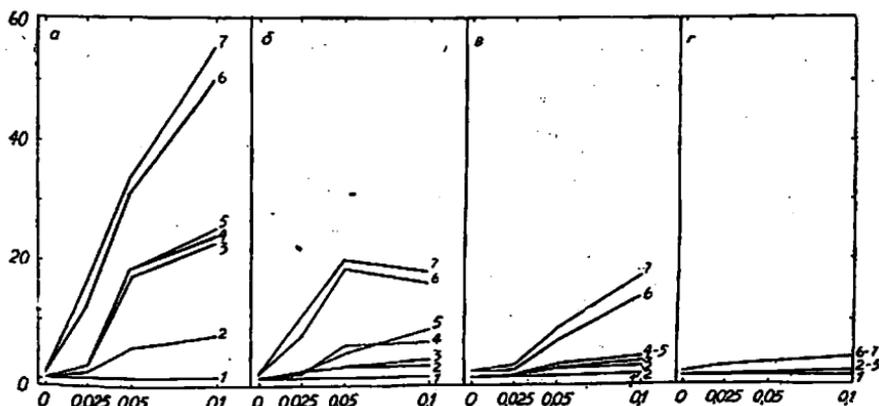


Рис. 3. Действие цитрата, малеата, сукцината, аспартата, ацетиласпартата и кетоглутарата на активность растворимой глутаминазы (рН 8,0) в присутствии различных тиреоидных соединений (ТС) (рН 8,0). а—активность фермента в присутствии Т<sub>3</sub>; б—Т<sub>3</sub>УК; в—Т<sub>2</sub>; г—Т<sub>4</sub>. 1—ТС; 2—ТС+АК (50 мМ); 3—ТС+ААК (50 мМ); 4—ТС+КГ (50 мМ); 5—ТС+СТ (50 мМ); 6—ТС+ЦТ (60 мМ); 7—ТС+МТ (50 мМ). По оси абсцисс—концентрация тиреоидных соединений, мМ; по оси ординат—активность фермента, μмоль NH<sub>3</sub>/мг белка, n = 10—12.

Из полученных данных становится ясно, что потенцирующий эффект гормона находится в зависимости от количества атомов йода в его молекуле. Для проявления максимального эффекта гормона необходимо наличие трех атомов йода и целостности аланинового радикала в молекуле тиронина. В то же время при увеличении на атом йода гормон (Т<sub>4</sub>) утрачивает потенцирующую способность, а с уменьшением на атом йода (Т<sub>2</sub>) эффективность ТС сильно падает.

Итак, выяснилось, что из двух гормонов щитовидной железы только Т<sub>3</sub> активно действует на растворимую глутаминазу мозга. Специфичность эффекта Т<sub>3</sub> интересна, так как в органах-мишенях регуляция обменных процессов обычно протекает с участием как Т<sub>4</sub>, так и Т<sub>3</sub>.

Работами ряда исследователей было установлено, что фосфат усиливает стимулирующее действие других модуляторов на активность глутаминазы мозга [17—19]. Потенцирующее действие фосфата проявляется и в опытах с мембраносвязанной глутаминазой митохондрий (неопубликованные данные). Исследования, проведенные с растворимой глутаминазой мозга (рис. 4), показали, что при сочетанном применении фосфата с другими модуляторами их эффект возрастает от 1,5 до 3 раз, а степень повышения активности фермента при низких концентрациях фосфата выражена несколько сильнее, чем при высо-

ких. Здесь важно отметить, что при сочетанном применении ЦТ с МТ, СТ, КГ, ААК или АК, а также при любых других сочетаниях этих соединений не происходит сколько-нибудь заметного повышения активности фермента.

Таким образом, можно прийти к выводу, что в процессе регуляции активности растворимой глутаминазы мозга среди всех испытанных эффекторов особое место занимают фосфат и  $T_3$ . Вместе с этим можно отметить, что фосфат, хотя и является самым эффективным активатором фермента, однако в координировании действия других модуляторов более важная роль принадлежит  $T_3$ .

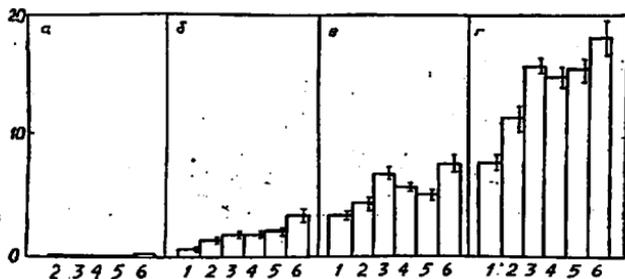


Рис. 4. Действие цитрата, сукцината, аспартата, ацетиласпартата и кетоглутарата на активность растворимой глутаминазы мозга в присутствии фосфата (рН 8,0). а—активность фермента в отсутствие фосфата; б—в присутствии 6,25 мМ  $P_i$ ; в—12,5 мМ  $P_i$ ; г—25 мМ  $P_i$  1— $P_i$ , 2— $P_i$ +КГ (50 мМ); 3— $P_i$ +АК (50 мМ); 4— $P_i$ +СТ (50 мМ); 5— $P_i$ +ААК (50 мМ). По оси ординат—активность фермента, мкмоль  $NH_3$ /мг белка,  $n=10-12$ .

В регуляции активности глутаминазы участвует и ряд других гормонов. Диэтилstilбестрол оказывает двойное действие на активность глутаминазы мозга: в зависимости от применяемого активатора в одном случае ингибирует, в другом—усиливает их эффект [20]. Глутаминаза митохондриальной фракции печени стимулируется глюкагоном, вазопрессинном, норадреналином и ангиотензином-II. Среди них наиболее эффективным является глюкагон, в присутствии которого активность фермента повышается в 2,5 раза [21]. Однако ТГ являются специфическими активаторами глутаминазы и занимают ключевое положение в процессе регуляции активности этого фермента [5—10, 16].

Известно, что ФЗГ мозга и почек, имея субъединичную структуру и благодаря способности ассоциировать и диссоциировать в буферных системах, может существовать в различных взаимопревращающихся молекулярных формах [22, 23]. Установлено, что фосфат и борат способствуют быстрой кооперации субъединиц и приводят к образованию димера, а в случае совместного их применения—полимера, которые являются более активными формами фермента [24—26]. Можно допустить, что в наших опытах в присутствии фосфата повышение актив-

ности глутаминазы происходит вследствие его димеризации, но при этом, по-видимому, не наблюдается полного завершения этого процесса, а в случае совместного добавления фосфата с  $T_3$  либо завершается процесс димеризации, либо фермент приобретает совершенно новую конформацию, переходя в высокоактивное олигомерное или полимерное состояние. Отсутствие заметного повышения активности фермента в присутствии  $T_3$  или других эффекторов, добавленных в отдельности, можно объяснить тем, что эти соединения сами по себе не вызывают каких-либо изменений в четвертичной структуре фермента, а при их совместном применении повышение активности глутаминазы происходит, вероятно, вследствие образования ассоциатов из мономерных форм фермента.

В настоящее время, по-видимому, трудно сказать какие молекулярные формы глутаминазы функционируют в клетках организма, происходит ли их взаимопревращение и чем это обусловлено. Надо полагать, что растворимая глутаминаза—это та часть мембраносвязанной формы фермента, которая, будучи не прочно связанной со структурными элементами митохондрий мозга, с переходом в раствор превращается в иную молекулярную форму, приобретая при этом другие регуляторные свойства. В то же время оставшийся в осадке фермент прочно связан и перевести его в раствор не удастся. Наряду с этим было показано, что многократное повторное замораживание и размораживание осадка гомогенатов почек крыс приводило к высвобождению все новых и новых порций растворимой глутаминазы с присущими ей регуляторными свойствами [12]. На основании этих данных можно предположить, что растворимая и мембраносвязанная формы глутаминазы почек—это взаимопревращающиеся молекулярные формы, и в связанном состоянии фермент имеет одну олигомерную структуру, а в свободном—другую. Возможно, именно этим обусловлено различие их регуляторных свойств.

Надо отметить, что растворимая и мембраносвязанная глутаминазы как мозга, так и почек обладают идентичными регуляторными свойствами [5, 8—10, 12] и, можно думать, что прочная связь мозговой глутаминазы с мембранами митохондрий обусловлена спецификой белкового и липидного окружения фермента. Конечно, трудно сказать, может ли функционировать в клетке растворимая глутаминаза как таковая и каковы механизмы регуляции её высвобождения и связывания. Однако из вышесказанного следует, что в регуляции активности глутаминазы, помимо многочисленных низкомолекулярных соединений физиологической природы, очевидно, немаловажную роль играют липиды и белки внутренней мембраны митохондрий.

# PHOSPHATE-DEPENDENT SOLUBLE GLUTAMINASE FROM RAT BRAIN: ROLE OF DIFFERENT AGENTS IN THE MODULATION OF ITS ACTIVITY

BEDJANYAN K. D., BADALYAN L. L., OGANESYAN V. C.

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

Phosphate turned to be the sole effective activator of soluble phosphate-dependent glutaminase (PDG) from brain tissue. Stimulating effect of maleate (MT), citrate (CT) and 3,3',5-triiodo-L-tyronine ( $T_3$ ) comprises 5,0,3,0 and 1.3% of phosphate effect, respectively. Succinate (ST),  $\alpha$ -ketoglutarate ( $\alpha$ -KG), N-acetyl-L-aspartate (N-AA), L-aspartate-(A), 3,5-diiod-L-tyronine ( $T_2$ ) and 3,3',5-triiodoacetic acid ( $T_3AA$ ) exert no effect on PDG. Thyroid compounds (TC), except for  $T_4$  potentiate the effect of phosphate and other modulators:  $T_3$  proved to be the most effective one, potentiating the effect of low concentration of phosphate 10-fold, that of other TC-several tens-fold. Joint addition of phosphate and CT, ST,  $\alpha$ -KG, N-AA or A enhances the effect not more than 3-fold.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Nimmo G., Tipton K. F. J. Neurochem., v. 33, p. 1083-1094, 1979.
2. Nimmo G., Tipton K. F. Biochem. Pharmacol., v. 29, p. 359-367, 1980.
3. Nimmo G., Tipton K. F. Biochem. Pharmacol., v. 30, p. 1635-1641, 1981.
4. Nimmo G., Tipton K. F. Eur. J. Biochem., v. 117, p. 57-64, 1981.
5. Оганесян В. С., Бунятыан Г. Х., Микиртумова К. С., Бадалян Л. Л. Вопр. биохимии мозга, т. 6, с. 5-13, Ереван, Изд-во АН АрмССР, 1970.
6. Оганесян В. С., Бадалян Л. Л., Микиртумова К. С., Саакян Ж. Дж. Вопр. биохимии мозга, т. 6, с. 5-13, Ереван, Изд-во АН АрмССР, 1970.
7. Бадалян Л. Л., Бунятыан Г. Х., Оганесян В. С. Вопр. биохимии мозга, т. 10, с. 40-54, Ереван, Изд-во АН АрмССР, 1975.
8. Оганесян В. С., Амбарцумян В. Г., Беджаниян К. Д. Нейрохимия, т. 3, с. 372-381, 1984.
9. Саакян Ж. Дж., Оганесян В. С. Биол. журн. Армении, т. 35, № 4, с. 264-271, 1982.
10. Оганесян В. С., Саакян Ж. Дж., Айрапетян Р. Л., Бунятыан Г. Х. Биол. журн. Армении, № 33, с. 932-940, 1980.
11. Оганесян В. С., Бадалян Л. Л., Бунятыан Г. Х. Докл. АН АрмССР, 69, с. 243-245, 1979.
12. Бадалян Л. Л., Оганесян В. С. Биол. журн. Армении, т. 35, № 1, с. 29-36, 1982.
13. Паладин А. В., Кирсенко О. Б. Биохимия, т. 26, с. 385-390, 1961.
14. Силакова А. И., Труш Г. П., Являкова А. Вопр. мед. химии, т. 5, с. 538-545, 1962.
15. Lowry O. H., Rosenbrough N. T., Farr A. L., Randall R. G. J. Biol. Chem., v. 193, p. 265-275, 1951.
16. Оганесян В. С., Микиртумова К. С., Бунятыан Г. Х. Вопр. биохимии мозга, т. 12, с. 5-12, 1977.
17. Оганесян В. С., Бунятыан Г. Х., Бадалян Л. Л., Микиртумова К. С. Вопр. биохимии мозга, т. 5, с. 5-16, 1969.
18. Weil-Matherbe H. J. Neurochem., v. 16, p. 855-864, 1969.

19. *Svenneby G. J.*, *Neurochem.*, v. 18, p. 2201—2208, 1971.
20. *Микиртумова К. С., Айрапетян Р. Л., Оганесян В. С., Бунятыян Г. Х.* *Вопр. биохимии мозга*, т. 11, с. 17—28, 1976.
21. *Corvera S., Garcia-Sainz J. A.* *Biochem. J.*, v. 219, p. 957—950, 1983.
22. *Svenneby G., Torgner I. Aa., Kvamme E. J.* *Neurochem.*, v. 20, p. 1217—1224 1973.
23. *Olsen B. R., Torgner I. Aa., Christensen T. B., Kvamme E. J.* *Mol. Biol.*, v. 74, p. 239—251, 1973.
24. *Kvamme E., Svenneby G., Tveit B.*—In: *Regulation of Enzyme Activity and Allosteric Interactions* (eds. *Kvamme E., Pihl A.*), *FEBS Symposium*, p. 89, Universitetsforlaget, Oslo, 1968.
25. *Svenneby G., Tveit B., Kvamme E. J.* *Biol. Chem.*, v. 245, p. 1878—1882, 1970.
26. *Godfrey S., Kuhlenschmidt T., Curtoys N. P.* *J. Biol. Chem.*, v. 252, p. 1927—1951, 1977.

Поступила 26. VI 1985

---

## НОВЫЕ КНИГИ

*Receptor Biochemistry and Methodology* (ed. by *J. C. Venter* and *L. C. Harrison*), *John Wiley & Sons Ltd, England.*

Новая серия книг, посвященных молекулярным аспектам изучения структуры и биохимических основ действия рецепторов, а также необходимой методологии их исследования. Первые три тома этой серии содержат обзоры, касающиеся общих подходов и специфической технологии, необходимых для проведения работ по изолированию, очистке и биохимической характеристике белков клеточной поверхности.

Том 1: Мембраны, детергенты и солюбилизация рецепторов, 238 с., 1984 г.

Том 2: Процедуры очистки рецепторов, 184 с., 1984 г.

Том 3: Молекулярные и химические характеристики рецепторов мембран, 306 с., 1984 г.