БИОХИМИЯ

УДК 612.8.015

Академик АН Армянской ССР Г. Х. Бунятян, А. В. Арутюнян

Влияние дрожжевой гексокиназы на образование аммиака из адениннуклеотидов в мозговой ткани

(Представлено 13/1 1968)

В предыдущих исследованиях нами было установлено, что при добавлении к гомогенатам мозга крыс аденозинтрифосфата (АТФ) и гексокиназы в присутствии глюкозы и янтарной кислоты происходит интенсивное образование аммиака. Выход аммиака составлял 85% от содержания аминокислот, добавленного АТФ⁽¹⁾. Мы склонны были объяснить это явление регенерированием АТФ в условиях окислительного фосфорилирования. Однако в ходе дальнейших экспериментов мы столкнулись с интересным фактом. Оказалось, что прирост аммиака под действием гексокиназы в гомогенатах мозга наблюдается при добавлении АТФ, а также других адениннуклеотидов, и в отсутствие глюкозы и янтарной кислоты.

Как видно из данных, представленных в табл. 1, добавление гексокиназы приводит примерно к одинаковому увеличению продукции аммиака из аденозинмонофосфата (АМФ), аденозиндифосфата (АДФ) и АТФ.

Таблица 1

Влияние гексокиназы на образование аммиака (в мкг N на пробу) из адениннуклеотидов в гомогенатах головного мозга крыс

Условия опыта	Содержание аммиака
Гомогенат	28,5 (6)
Гомогенат + гексокиназа	54,3 (6)
Гомогенат + АТФ	55,3 (6)
Гомогенат + АТФ + гексокиназа	142,0 (6)
Гомогенат + АДФ	50,65 (6)
Гомогенат + АДФ + гексокиназа	157,9 (6)
Гомогенат + АМФ	46,8 (6)
Гомогенат + АМФ + гексокиназа	165,2 (6)

Объем реакционной смеси 2 мл: 1 мл 20-процентного гомогената + 0,5 мл 0,2 М Tris—HCl буфере pH 7,4 + 0,5 мл раствора, содержащего по 14 мкмоль АТФ, АДФ или АМФ и 1,5 мг кристаллической гексокиназы. Инкубация—при 37° в аэробных условиях.

Мы предположили, что применяемые нами препараты дрожжевой гексокиназы (Hexokinase type III GMBH & Co. München, Hexokinase type II and III Sigma Chemical Company) обладают деаминазной активностью в отношении аденинмононуклеотидов или являются негодными и содержат некоторое количество адениловых соединений. Впоследствии было установлено, что при инкубировании гексокиназы с АМФ, АДФ или АТФ без ткани не отмечалось образования аммиака, что свидетельствует о том, что гексокиназа не проявляет деаминазной активности. Для того, чтобы исключить участие глюкозы в эффекте гексокиназы, дальнейшие эксперименты были поставлены на митохондриальной фракции мозга, в которой содержание глюкозы незначительно. Кроме того, по литературным данным, в очищенных митохондриях гликолиз почти не протекает (2-5). Результаты исследований, приведенные в табл. 2, показывают, что гексокиназа способствует интенсивному выделению аммиака из адениннуклеотидов и в митохондриальной фракции. Так, например, из АТФ при инкубации в Tris—HCl буфере образуется 13,95 мкг N на 1 мг белка, а в присутствии гексокиназы—44,55 мкг N на 1 мг белка, т. е. количество аммиака увеличивается более, чем в 3 раза. Добавление глюкозы в этих условиях не влияет на продукцию аммиака из АТФ. Интересно отметить, что гексокиназа почти не действует на образование аммиака из аденозина и никотинамидадениндинуклеотида, таким образом она избирательно влияет на ферменты, деаминирующие аденинмононуклеотиды. Как видно из полученных результатов, сведенных в табл. 2, сама гексокиназа продуцирует некоторое количество аммиака при инкубации с митохондриальной фракцией мозга. Как уже было отмечено, это может происходить вследствие наличия примесей адениннуклеотидов в применяемых препаратах гексокиназы. Однако, это предположение отпало, так как препараты используемой нами гексокиназы не обладали оптической активностью в ультрафиолетовых лучах при $\lambda = 260$ мкм, являющейся максимальной зоной поглощения для адениловых соединений. Вполне вероятно, что прирост аммиака в опытах с добавлением гексокиназы без адениннуклеотидов обусловлен ее влиянием на эндогенные адениловые соединения. Результаты, полученные нами при инкубации прокипяченной митохондриальной фракции в присутствии АМФ, АДФ или АТФ и гексокиназы, свидетельствуют об отсутствии образования аммиака в этих условиях и подтверждают данные о том, что гексокиназа не обладает деаминазной активностью в отношении адениннуклеотидов (табл. 2 и 3). Гексокиназа не оказывает влияния на продуцирование аммиака после кипячения, что указывает на то, что этот эффект связан с ферментативными свойствами препарата (табл. 2). Гексокиназа не вызывает прироста аммиака также в опытах с диализированной митохондриальной фракцией (табл. 2). Она не активирует продуцирование аммиака из адениловых соединений и тогда, когда к прокипяченной митохондриальной фракции добавляется АМФ-аминогидролаза (табл. 3). Нами

Таблица 2

Влияние гексокиназы на образование аммиака (в $\mu\text{кг N}$ на мг белка) из адениловых соединений в митохондриальной фракции мозга крыс

Условия опыта	Митохондриальная фракция	Условия опыта											
		+Гексокиназа (1,5 мг)	+АТФ (14 $\mu\text{моль}$)	+АТФ (14 $\mu\text{моль}$) + гексокиназа (1,5 мг)	+АТФ (14 $\mu\text{моль}$) + глюкоза (26 $\mu\text{моль}$)	+АТФ (14 $\mu\text{моль}$) + глюкоза (26 $\mu\text{моль}$) + гексокиназа (1,5 мг)	+АМФ (14 $\mu\text{моль}$)	+АМФ (14 $\mu\text{моль}$) + гексокиназа (1,5 мг)	+Аденозин (14 $\mu\text{моль}$)	+Аденозин (14 $\mu\text{моль}$) + гексокиназа (1,5 мг)	+НАД (7 $\mu\text{моль}$) + никотинамид (7 $\mu\text{моль}$)	+НАД (7 $\mu\text{моль}$) + никотинамид (7 $\mu\text{моль}$) + гексокиназа (1,5 мг)	
Инкубация—60 мин.	6,08 (8)	10,7 (8)	13,95 (8)	44,55 (8)	13,8 (8)	43,4 (8)	15,4 (8)	38,15 (8)	15,6 (6)	20,75 (6)	9,42 (5)	12,06 (5)	
Перед инкубацией гексокиназа прокипячена 10 мин. при 100°C. Инкубация—60 мин.	6,45 (8)	8,25 (8)	13,61 (8)	15,9 (8)	—	—	15,25 (8)	18,04 (8)	—	—	—	—	
Перед инкубацией митохондрии прокипячены 15 мин. при 92°C. Инкубация—60 мин.	3,28 (6)	5,92 (6)	3,95 (6)	6,28 (6)	—	—	2,98 (6)	5,52 (6)	—	—	—	—	
Митохондрии диализовали 24—28 ч. против 0,25 М раствора сахарозы. Инкубация—60 мин	3,41 (8)	6,11 (8)	14,2 (8)	16,61 (8)	—	—	14,51 (6)	16,58 (8)	—	—	—	—	

использовался фермент, выделенный из дрожжей, выпускаемый Sigma Chemical Company. Следовало полагать, что отсутствие эффекта гексокиназы связано с разрушением при кипячении или удалением при диализе каких-то низкомолекулярных соединений. Для выяснения

Таблица 3

Влияние гексокиназы на образование аммиака из АМФ в прокипяченной митохондриальной фракции мозга в присутствии АФМ-аминогидролазы

Условия опыта	NH ₃ в мкг N на 1 мг белка
АМФ (5 мкмоль)	1,25 (6)
АМФ (5 мкмоль) + гексокиназа (1 мг)	1,05 (6)
АМФ + АМФ-аминогидролаза (4 ед.)	7,56 (6)
АМФ + АМФ-аминогидролаза + гексокиназа	8,04 (6)

Инкубация—20 минут в 0,2 М Tris—HCl буфере pH 7,4.

образование аммиака из адениннуклеотидов в присутствии гексокиназы и митохондрий, являются кислотолабильными соединениями.

Таблица 4

Образование аммиака из АМФ и АДФ в диализированной митохондриальной фракции при добавлении к ней надосадочной жидкости, полученной при обработке митохондрий 2,5 н. HCl. Инкубация—60 мин. в 0,2 М Tris—HCl буфере pH 7,4

Условия опыта	NH ₃ в мкг N на 1 мг белка
АТФ (14 мкмоль)	14,2 (6)
АТФ + гексокиназа (1,5 мг)	17,1 (6)
АТФ + надосад. жидкость	15,3 (6)
АТФ + надосад. жидкость + гексокиназа	20,14 (6)
АМФ (14 мкмоль)	12,8 (6)
АМФ + гексокиназа	14,62 (6)
АМФ + надосад. жидкость	17,8 (6)
АМФ + надосад. жидкость + гексокиназа	21,6 (6)

Таблица 5

Влияние гексокиназы на образование аммиака в диализированной митохондриальной фракции мозга при добавлении к ней лиофилизированного диализата.

Инкубация—60 мин. в 0,2 М Tris—HCl буфере pH 7,4

Условия опыта	NH ₃ в мкг N на 1 мг белка
АМФ (14 мкмоль)	11,92 (6)
АМФ + гексокиназа (1,5 мг)	15,21 (6)
АМФ + лиофилизат	12,06 (6)
АМФ + гексокиназа + лиофилизат	24,08 (6)
АТФ (14 мкмоль)	13,76 (6)
АТФ + гексокиназа (1,5 мг)	15,08 (6)
АТФ + лиофилизат	13,81 (6)
АТФ + гексокиназа + лиофилизат	22,21 (6)

В следующей серии опытов, результаты которых представлены в табл. 5, к диализированной митохондриальной фракции добав-

лялся диализат, собранный нами при многократном диализе и пролиофилизированный в аппарате КФ-30. В этих условиях гексокиназа вновь приобретает свойство активировать продуцирование аммиака из добавленных адениннуклеотидов, правда, несколько в меньшей степени, чем в опытах, в которых гексокиназа добавлялась к недиализированной митохондриальной фракции. На основании проведенных исследований мы пришли к выводу, что эффект гексокиназы связан с ферментативными свойствами препарата и может быть опосредствован какими-то лабильными низкомолекулярными эндогенными соединениями. Подлежит изучению действие гексокиназ, выделенных из различных тканей, на деаминирование адениннуклеотидов, так как, по литературным данным, гексокиназы дрожжевого происхождения и тканевые гексокиназы не идентичны по ряду свойств (6).

Известно, что гексокиназа в мозгу локализована, в основном, в митохондриальной фракции (7, 8), а очищенные митохондрии не обладают гликолитической активностью. В этой связи полученные результаты представляют определенный интерес, так как функция ключевого фермента гликолиза — гексокиназы в митохондриях мозга является не совсем ясной.

Институт биохимии
Академии наук Армянской ССР

Հայկական ՍՍՀ ԳԱ ակադեմիկոս Հ. Խ. ԲՈՒՆՅԱՔՅԱՆ, Ա. Վ. ՀԱՐՈՒԹՅՈՒՆՅԱՆ

Խմորասնկային հեֆոկինազայի ազդեցությունը ադենիննուկլեոտիդներից ամոնիակի առաջացման վրա ուղեղային հյուսվածքում

Այս աշխատանքում ուսումնասիրվել է հեֆոկինազայի ազդեցությունը ադենիննուկլեոտիդներից (ԱՄՖ, ԱԴՖ, ԱՏՖ) ամոնիակի առաջացման վրա ճագարների ուղեղի միտոքոնդրիալ ֆրակցիայում: Ցույց է տրվել, որ հեֆոկինազան նպաստում է նշված միացությունների ինտենսիվ դեամինացմանը: Սակայն հեֆոկինազան ավելացված ԱՄՖ-ից, ԱԴՖ-ից և ԱՏՖ-ից ամոնիակի առաջացման պրոցեսի վրա ակտիվացնող ազդեցություն չի թողնում ֆերմենտի եռացման, դիալիզի, ինչպես նաև միտոքոնդրիտները եռացնելու դեպքում: Երբ դիալիզված միտոքոնդրիտներին ավելացվում է լիոֆիլիզացրված դիալիզատը, այդ դեպքում հեֆոկինազան կրկին նպաստում է ամոնիակի առաջացմանը ադենիննուկլեոտիդներից: Այդ ցույց է տալիս, որ հեֆոկինազայի էֆեկտը կապված է ինչպես նրա ֆերմենտատիվ հատկության, նույնպես և միտոքոնդրիալ ֆրակցիայում առկա դիալիզվող միացությունների հետ:

Л И Т Е Р А Т У Р А — Գ Ր Ա Վ Ա Ն Ո Ւ Թ Յ Ո Ւ Ն

- ¹ Г. Х. Бунятян и А. В. Арутюнян, Вопросы биохимии мозга, Изд. АН АрмССР, 2, 23 (1966). ² E. De Robertis, A. P. De Irladi, G. R. Arnaiz de Lopez and L. Salganicoff, J. Neurochem., 9, 23 (1962). ³ E. G. Brunngaber, V. Aguilar and W. G. Occomy, J. Neurochem., 10, 433 (1963). ⁴ R. Tanaka and L. G. Abood, J. Neurochem., 10, 571 (1963). ⁵ М. Руцак, Е. Мацейова, Д. Руцакова и Э. Мрена, Укр. биох. журн., 36, 584 (1964). ⁶ K. Uyeda and E. Racker, J. Biol. Chem., 240, 12, (1965). ⁷ L. G. Abood, E. G. Brunngaber and M. Taylor, J. Biol. Chem., 234, 1307 (1959). ⁸ S. E. Wilson, Biochem. Biophys. Research, Commun., 28, 123 (1967).