ՀԱՅԿԱԿԱՆ ՍՍՀ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԿԱԴԵՄԻԱՅԻ ՉԵԿՈՒՅՑՆԵՐ
ДОКЛАДЫ АКАДЕМИИ НАУК АРМЯНСКОЙ ССР

LXIX 1979 5

УДК 591.1.05

БИОХИМИЯ

Ж. С. Геворкян

Фосфорилирование и дефосфорилирование ферментов, осуществляющих деаминирование L-аминокислот в почечной ткани, как механизм регуляции их активности

(Представлено академиком АН Армянской ССР Г. Х. Буниятяном 12/VI 1979)

Реакции фосфорилирования белков представляют собой одно из важных биологических явлений, присущих живой системе. За последнее время эти процессы интенсивно изучаются, и уже накоплены многочисленные данные, свидетельствующие о важном значении этих реакций для регуляции деятельности ряда белков, выполняющих пластические и ферментативные функции, действие которых контролируется циклическим аденозинмонофосфатом. Многочисленными исследованиями установлено, что активность ряда ферментов повышается при их фосфорилировании и, наоборот, снижается при дефосфорилировании. В этом отношении представляют интерес такие ферменты, как: фосфорилаза *b*, щелочная фосфатаза, тирозин-аминотрансфераза, киназа фосфорилазы *b*, Na+K-активируемая АТФаза и др. Интересно отметить, что некоторые ферменты проявляют высокую активность в дефосфорилированном состоянии и, наоборот, при фосфорилировании их активность снижается. В качестве примера таких ферментов можно привести гликоген-синтетазу, дегидрогеназу пировиноградной кислоты и др [1, 2].

Вышеупомянутые исследования проводились главным образом в отношении ферментов печеночной ткани, между тем как ферменты и белки почечной ткани с этой точки зрения изучены недостаточно. Было показано, что действие антидиуретического и паратиреоидного гормонов на деятельность почек осуществляется через фосфорилирование мембранных белков клеток почечных канальцев, с участием цАМФ-зависимой протеинкиназы [3, 4].

Наши прежние исследования показали, что при высоком энергетическом состоянии почечной ткани (корковый слой), т. е. при наличии в ней высокого содержания АТФ, активность ферментов, осуществляющих деаминирование ряда L-аминокислот (глутаминовая, аспарагиновая, орнитин), высокая и, наоборот, при наличии низкого содержания АТФ активность этих ферментов резко снижается [5, 6].

Имея в виду вышеизложенное, мы предполагали, что в корковом слое почек процессы фосфорилирования и дефосфорилирования упомянутых ферментов можно представить как возможный механизм, регулирующий их активность в физиологических условиях.

В связи с тем, что процессы деаминирования L-аминокислот в коре почек тесно связаны с целостностью клеточных плазматических мембран (как это показали наши прежние исследования), нам не удалось выделить в более или менее чистом виде ферментный препарат, обладающий L-аминокислотдеаминирующей активностью. В связи с этим мы провели ряд исследований со срезами почек по изучению влияния фосфорилирования и дефосфорилирования клеточных белков на аминокислотдеаминирующую способность почечной ткани (на продукцию аммиака из добавленных L-аминокислот). С этой целью изучали изменение активности упомянутых ферментов (по продукции аммиака из добавленных аминокислот) при фосфорилировании белков почечной ткани в контрольных опытах и при их дефосфорилировании под действием щелочной фосфатазы (чистый препарат Reanal), экстракта коркового слоя почечной ткани (обладающей высокой фосфопротеинфосфатазной активностью), сыворотки крови, DI-этионина, а также влияние различных условий инкубации (высокое и низкое парциальное давление кислорода) на дефосфорилирование белков почечной ткани и на ее L-аминокислотдеаминирующую способность.

Предварительно экспериментальным животным (белые крысы) внутрибрюшинно вводилась АТФ (γ-P^{32}) в количестве 50μ Ci (специфическая активность 19,5 mCi/*мМ*), через три часа забивали их путем декапитации, удаляли почки и в холодных условиях приготовляли срезы, которые (по 100 *мг*) инкубировали в Кребс-Рингер-бикарбонатном буфере (pH—7,4) или в сыворотке крови, в атмосфере высокого (O_2—95% и CO_2—5%) или низкого парциального давления кислорода (воздуха) в зависимости от условий опыта, при t —37°C, в течение одного часа, после чего в инкубационной среде определяли содержание радиоактивного фосфора, отщепленного из фосфопротеинов и АТФ в срезах, с использованием люциферин-люциферазы. В параллельных опытах, проведенных в тех же условиях, определяли количество аммиака, образовавшегося из добавленных аминокислот под влиянием вышеупомянутых факторов. На каждую пробу добавляли: аминокислоты по 16 мкМ, щелочную фосфатазу — 1 *мг*, экстракт почек, соответствующий 0.2 *г* ткани (приготовленный на Кребс-Рингер-бикарбонатном буфере), сыворотку крови — 1,8 *мл*, DI-этионин — 2.6 *мг*.

Как видно из приведенных данных (рис. 1, *а—в*), в контрольных опытах, где белки и ферменты почечной ткани интактны и их фосфорилированность и каталитическая активность высока и соответствует физиологическим условиям, из добавленных аминокислот (глутаминовая, аспарагиновая, орнитин) образуется значительное количество свободного аммиака, причем из орнитина и аспарагиновой кислоты намного больше, чем из глутаминовой кислоты. В присутствии щелочной фос-

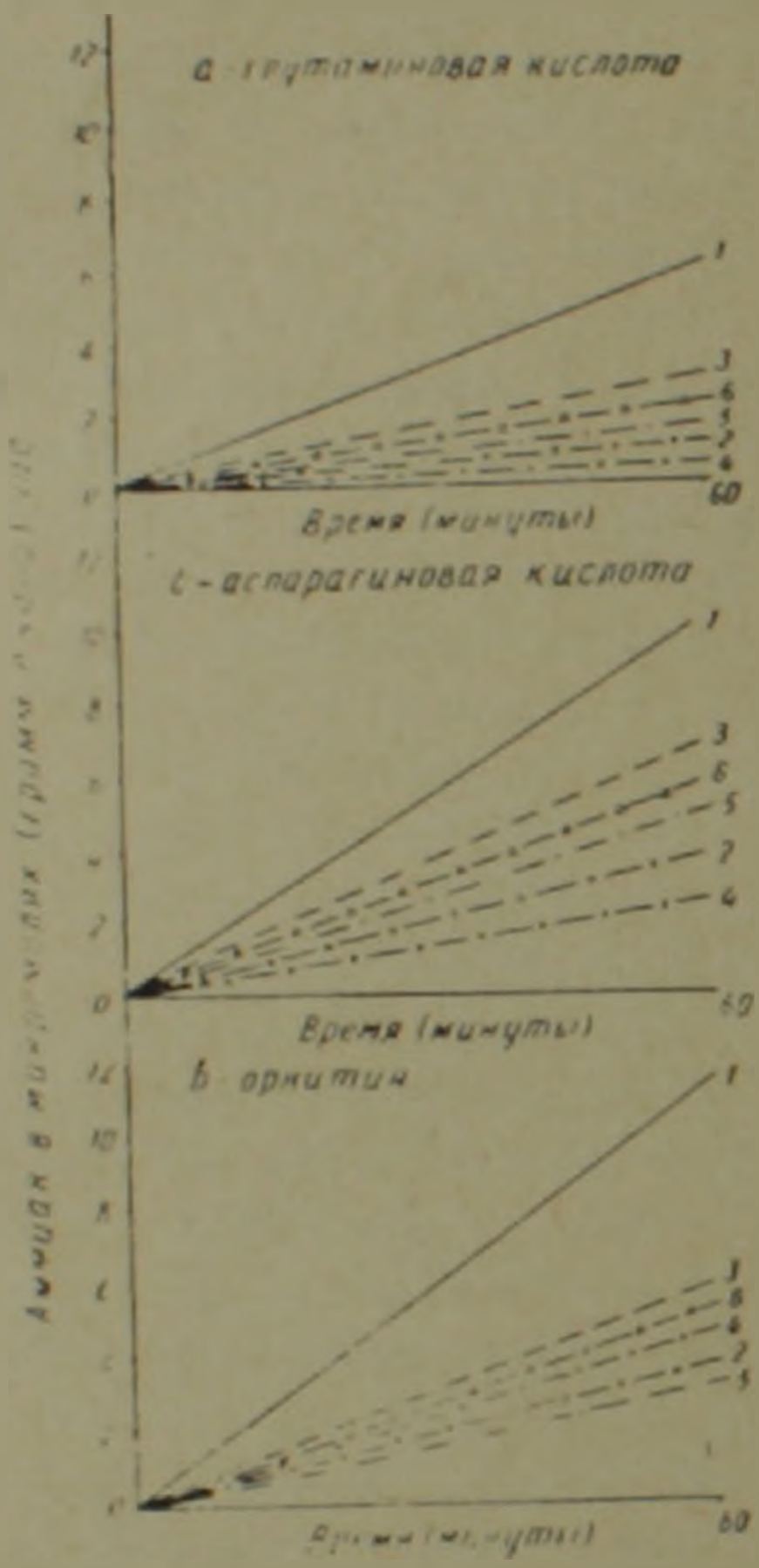

Рис. 1. Влияние различных факторов на образование аммиака из добавленных аминокислот: *1* — контроль (инкубация в атмосфере $O_2 + CO_2$); *2* — инкубация в атмосфере воздуха; *3* — щелочная фосфатаза; *4* — инкубация в среде сыворотки крови; *5* — экстракт почек; *6* — DL-этионин

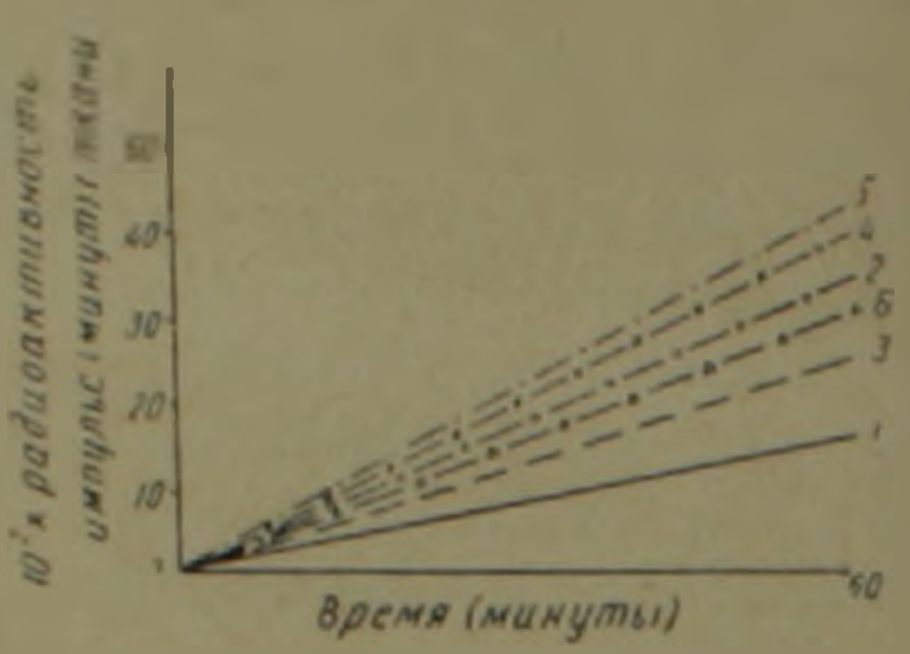

Рис. 2. Влияние различных факторов на дефосфорилирование почечной ткани Обозначения те же, что и на рис. 1

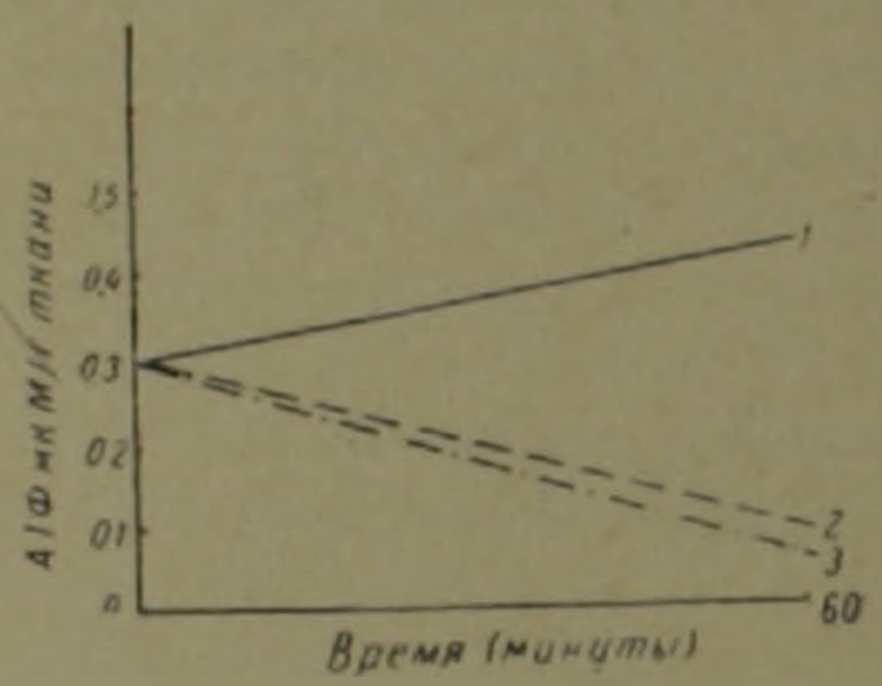

Рис. 3 Влияние различных условий инкубации на содержание АТФ в срезах почек *1* — инкубация в атмосфере $O_2 + CO_2$. *2* — инкубация в атмосфере воздуха; *3* — инкубация в среде сыворотки крови

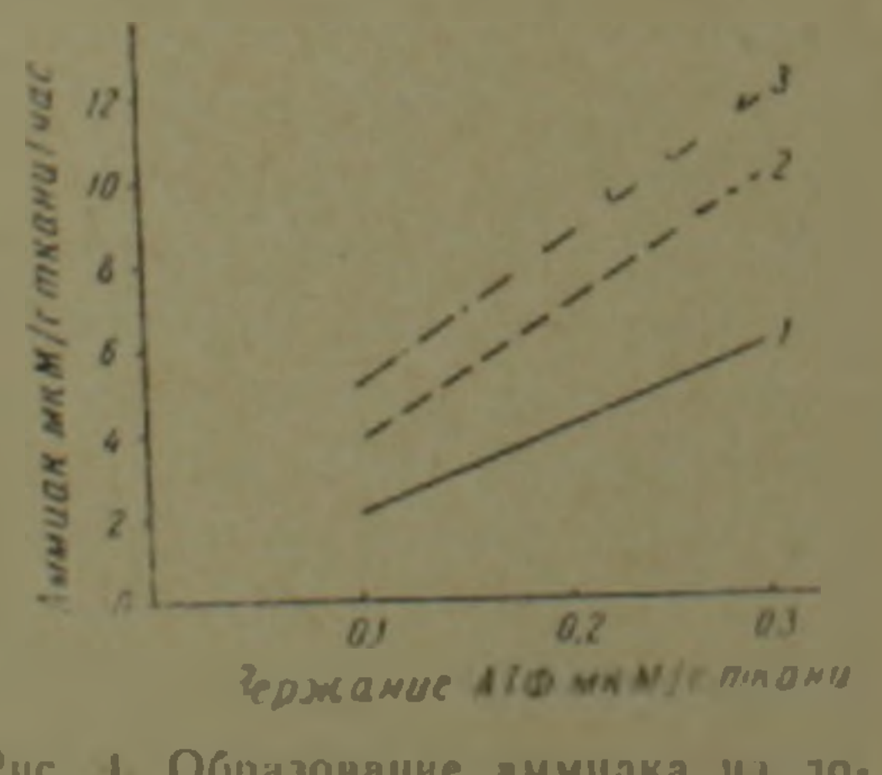

Рис. 4. Образование аммиака из добавленных аминокислот в зависимости от содержания АТФ в почечной ткани; *1* — глютаминовая кислота; *2* — аспарагиновая кислота; *3* — орнитин

фатазы наблюдается ингибирование процессов деаминирования добавленных аминокислот и в результате — значительное снижение продукции аммиака из них. Экстракт почек также оказывает подавляющий эффект, в значительной мере превосходящий таковой, наблюдаемый при действии щелочной фосфатазы. Выраженное подавление деаминирования аминокислот наблюдается при инкубации срезов почек в сыворотке крови. Это особенно отмечается в отношении глутаминовой кислоты, образование аммиака из которой иногда почти полностью прекращается, между тем как деаминирование аспарагиновой кислоты и орнитина еще продолжает иметь место. Деаминирование аминокислот подавляется и при инкубации срезов почек в атмосфере воздуха, т. е. при низком парциальном давлении кислорода, между тем как при инкубации срезов в атмосфере высокого парциального давления кислорода, наоборот, наблюдается значительное усиление этих процессов.

Интересно отметить, что деаминирование L-аминокислот в значительной степени подавляется также под действием DI-этионина, под действием которого, как известно, наблюдается значительное снижение содержания АТФ в тканях ([7]).

Параллельно проведенные опыты (рис. 2) показывают, что факторы и условия, подавляющие образование аммиака из L-аминокислот, стимулируют дефосфорилирование белков почечной ткани и вызывают повышение содержания радиоактивного фосфора в инкубационной среде. Среди всех упомянутых факторов сравнительно выраженное действие оказывает экстракт почек.

Исследования по изучению изменения содержания АТФ под действием некоторых из указанных факторов показали (рис. 3), что инкубация срезов почек в атмосфере воздуха (в буфере), а также в среде сыворотки крови приводит к значительному снижению содержания этого макроэргического соединения, между тем как при инкубации срезов в среде Кребс-Рингер-бикарбонатного буфера в атмосфере высокого парциального давления кислорода содержание АТФ поддерживается на высоком уровне и часто превышает исходный уровень.

Из данных рис. 4 видно, что при наличии высокого содержания АТФ в почечной ткани, когда фосфорилированность белков также высокая, наблюдается высокая активность ферментов, осуществляющих деаминирование L-аминокислот, и, наоборот, при наличии низкого содержания АТФ в почечной ткани, когда фосфорилированность белков почек также низкая, активность упомянутых ферментов низкая.

Наши другие исследования показали, что когда содержание АТФ в почечной ткани высокое, включение меченого фосфора из АТФ в белки почек протекает более интенсивно, чем при низком содержании АТФ. Из этих данных можно заключить, что наряду с другими белками почечной ткани, при участии АТФ, подвергаются фосфорилированию также и белки-ферменты, осуществляющие деаминирование упомянутых L-аминокислот.

Таким образом, результаты наших исследований показывают су-

ществование тесной связи между содержанием АТФ, фосфорилированием белков почечной ткани и активностью ферментов, осуществляющих деаминирование L-аминокислот. Факторы и условия, способствующие дефосфорилированию белков или снижению содержания АТФ, приводят к подавлению активности этих ферментов и снижению продукции аммиака из добавленных аминокислот, и, наоборот, факторы способствующие повышению содержания АТФ и фосфорилированию белков почечной ткани, стимулируют активность этих ферментов

Фосфорилирование и дефосфорилирование белков в животных тканях являются одними из важных биологических явлений, принимающих участие в регуляции активности многочисленных ферментов (а также физиологически активных белков, выполняющих другие функции) в физнологических условиях. В этом отношении довольно хорошо изучены ферменты печеночной ткани, а почечные ферменты и белки изучены недостаточно, что же касается фосфорилирования ферментов, осуществляющих деаминирование L-аминокислот или вообще значения макроэргических соединений в этих процессах, в литературе об этом нет сведений, за исключением недавно появившейся статьи Геммингса ([8]), показавшего фосфорилирование НАД-зависимой глутаматдегидрогеназы у дрожжей.

Приведенные данные показывают, что фосфорилирование белков в почечной ткани и вообще содержание АТФ в ней имеют решающее значение для сохранения и функционирования активности ферментов, осуществляющих деаминирование L-аминокислот. Опыты показывают, что условия инкубирования, способствующие снижению содержания АТФ в почечной ткани, приводят к усилению дефосфорилирования белков и снижению активности ферментов, осуществляющих деаминирование L-аминокислот. Это отмечается при инкубации срезов почек в атмосфере воздуха и в среде сыворотки крови. Наоборот, условия, способствующие поддержанию АТФ в почечной ткани на высоком уровне, приводят к сохранению на высоком уровне как фосфорилированности белков, так и активности ферментов, осуществляющих деаминирование аминокислот, что отмечается при инкубации срезов в атмосфере высокого парциального давления кислорода, а также при введении АТФ экспериментальным животным, как это показали наши прежние исследования. Очевидно, высокое содержание АТФ в почечной ткани необходимо для поддержания аминокислотдеаминирующих ферментов в фосфорилированном состоянии, но не исключается возможность, что энергия АТФ необходима также для поддержания активной конформации белка-фермента. Это показывает, что процессы деаминирования L-аминокислот также являются энергозависимыми процессами. По литературным данным в фосфорилированном состоянии печеночная фосфорилаза более устойчива к действию внутриклеточных протеиназ. Наши исследования показали, что при инкубации срезов почек в атмосфере низкого парциального давления кислорода наблюдается значительное усиление протеолитических процессов, что не отмечается,

если инкубация проводится в атмосфере высокого парциального давления кислорода.

Следовательно, в первом случае в результате резкого снижения содержания АТФ в почечной ткани превалируют процессы дефосфорилирования белков-ферментов. В таком состоянии эти ферменты становятся более чувствительными к действию протеиназ, которые вызывают значительные изменения в структуре молекул ферментов и снижение их активности. При наличии высокого содержания АТФ белки-ферменты находятся в фосфорилированном состоянии, их активность сохраняется на высоком уровне, к тому же в таком состоянии они устойчивы к действию протеолитических ферментов. Нам не удалось выделить эти ферменты в более или менее чистом виде для изучения их активности в зависимости от состояния фосфорилирования и дефосфорилирования, так как при нарушении целостности клеточных плазматических мембран почечная ткань теряет аминокислотдеаминирующую активность, тем не менее исследования в этом направлении продолжаются.

Трудно объяснить механизм действия упомянутых разнородных факторов на процессы деаминирования L-аминокислот. Надо полагать, что щелочная фосфатаза, а также экстракт почек, обладающий высокой фосфопротеин-фосфатазной активностью, действуют на фосфопротеины и отщепляют остаток фосфорной кислоты, чем вызывают модификацию в структурах белков, в том числе и в структурах аминокислотдеаминирующих ферментов, приводящих к снижению их активности.

Инкубация срезов почек в атмосфере воздуха приводит к подавлению окислительных процессов и к резкому снижению содержания АТФ, необходимой для фосфорилирования белков. Подобный эффект оказывает и DI-этионин. В условиях резкого снижения содержания АТФ в почечных клетках превалируют процессы дефосфорилирования белков (под действием фосфопротеин-фосфатазы), в том числе и аминокислотдеаминирующих ферментов, что приводит к снижению их активности. Что касается сыворотки крови, которая также вызывает значительное снижение содержания АТФ, то необходимо провести дополнительные и более подробные исследования для выяснения механизма подобного действия. Наши исследования показали, что сыворотка крови белых крыс содержит низкомолекулярное белковое вещество, которое оказывает ингибирующее действие на процессы деаминирования L-аминокислот. Мы предполагаем, что наличием этого вещества в сыворотке крови и обуславливается ее действие на содержание АТФ и активность вышеупомянутых ферментов.

Институт биохимии
Академии наук Армянской ССР

Ժ. Ս. ԳԵՎՈՐԳՅԱՆ

Երիկամային հյուսվածքում L-ամինաթթուները դեամինացնող ֆերմենտների ֆոսֆորացումը և դեֆոսֆորացումը որպես նրանց ակտիվության կարգավորման մեխանիզմ

Փորձերը դրվել են սպիտակ առնետների վրա, նրանց նախօրոք սրսկվել է նշված ֆոսֆորով՝ ԱՏՖ։ Երեք ժամից հետո հեռացվել են երիկամները և հետազոտությունները շարունակվել նրանց կեղևային շերտի կտրվածքների վրա։

Յույց է տրվել, որ մի շարք ֆակտորներ (արյան շիճուկ, հիմնային ֆոսֆատազա, երիկամի էքստրակտ, Dl-լիմոնին, ինկուբացիա օդի պայմաններում), որոնք արագացնում են երիկամային հյուսվածքի սպիտակուցների դեֆոսֆորացումը, միաժամանակ նվազեցնում են ԱՏՖ-ի քանակը և առաջացնում L-ամինաթթուները դեամինացման ենթարկող ֆերմենտների ակտիվության բնկճում և ընդհակառակը, այն պայմանները, որոնք նպաստում են այդ սպիտակուցների ֆոսֆորացմանը, բարձրացնում են ԱՏՖ-ի քանակը և գրգռիրն խթանում նշված ֆերմենտների ակտիվությունը։

Ենթադրվում է, որ երիկամի այլ սպիտակուցների հետ միասին, նշված պայմաններում ֆոսֆորացման և դեֆոսֆորացման են ենթարկվում նաև վերը նշված ֆերմենտները և որ այդ երևույթը կարող է լինել այդ ֆերմենտների ակտիվության կարգավորման հնարավոր մեխանիզմ։

ЛИТЕРАТУРА—ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

[1] *F. C. Szoka, M. J. Ettinger*, J. Biol. Chem., 253, № 18 (1978). [2] *D. L. Friedman, J. Larner*, Biochem Biophys. Acta, 64, № 1 (1962). [3] *R. Kinne, L. J. Shlutz, E. Kinne-Shafran, J. L. Schwartz*, J. Membr. biol., 24 (1975). [4] *P. H. Sugden, P. J. Randle*, Biochem J., 173 № 2 (1978). [5] *Ж. С. Геворкян, А. С. Оганесян*, ДАН Арм ССР, 66, № 1 (1978). [6] *А Лайтз, М Шварц, Г. Сершен, Ж. С. Геворкян, А С. Оганесян*, ДАН АрмССР, т. 68, № 1 (1979) [7] *D. E Hyams, S. M. Sabesin, N. J. Greenberger, K. J. Isselbacher*, Biochem. Biophys. Acta, 125, № 1 (1966). [8] *B A. Hemmings*, J. Biol. Chem., 253, № 15 (1978).