

УДК 577.157

БИОХИМИЯ

Академик АН Армянской ССР Г. Х. Бунядян,
Г. А. Туршян, Г. Е. Акопян, С. С. Сафразян

Распределение активности γ -глутамилтранспептидазы,
глутаминсинтетазы, γ -глутамилтрансферазы в субцеллюлярных
фракциях мозга крыс

(Представлено 22/IV 1980)

Глутамин играет важную роль в центральной нервной системе как предшественник медиаторных аминокислот—глутамата, ГАМК, аспартата. В отличие от ГАМК и глутамата, он достаточно хорошо проникает в мозг через гематоэнцефалический барьер. Глутаминсинтетаза и глутаминаза—основные ферменты, регулирующие уровень глутамина и аммиака в мозгу.

Хамбергером (1) и Бадфорд (2) было показано, что глутамат, высвобожденный при деполяризации синапсом и срезов гиппокампа, образуется в основном за счет глутамина, а не глюкозы. В работах Салганикова и Де-Робертиса (3), Бадфорда и Варда (4) было показано высокое содержание глутаминазы в синапсомальной фракции мозга, освобожденной от митохондрий.

По данным Берга и Гарфинкеля (5), Балаша (6) глутаминсинтетаза в мозгу сосредоточена в глиальных клетках, а глутаминаза—в нейронах. В работах Варда и Бадфорда при помощи субцеллюлярного фракционирования гомогенатов мозга крыс было показано, что глутаминсинтетазой богата растворимая фракция и фермент переходит в растворимую фракцию из глиальных клеток (7).

Как известно, в обмене глутамина определенную роль играет γ -глутамилтранспептидаза (8), которая обладает способностью переносить γ -глутамильную группу не только от глутатиона и различных γ -глутамилпептидов, но и от глутамина на аминокислоты, амины, пептиды. γ -Глутамилтранспептидазе придается значение в транспорте аминов и аминокислот через γ -глутамильный цикл. Интересно, что γ -глутамилтранспептидаза, выделенная из почек и печени, обладает также очень слабо выраженной активностью переноса γ -глутамильного остатка от глутамина на гидроксиламин, образуя γ -глутамилгидрокси-

мат (*). Этот процесс известен как γ -глутамилтрансферазная реакция. По данным ряда авторов γ -глутамилтрансфераза идентична глутаминсинтетазе (9), хотя по этому вопросу нет единого мнения (10).

На основании приведенных данных, а также результатов наших предыдущих исследований по очистке глутаминсинтетазы (ГС) и γ -глутамилтрансферазы (ГТ) из растворимой фракции гомогенатов мозга мы задались целью изучить субцеллулярное распределение ГС, ГТ и γ -глутамилтранспептидазы в мозгу.

Исследования проводили на зрелых крысах весом 150—200 г. Субцеллулярные фракции получали из 10%-ного гомогената цельного мозга, приготовленного на растворе 0,25 М сахарозы в 0,01 М трис HCl буфере при pH 7,3. Гомогенат центрифугировали в течение 10 мин при 900 г, осадок—ядерную фракцию дважды промывали. Надосадочные жидкости соединяли и центрифугировали в течение 25 мин при 20 000 г, полученный осадок—митохондриальную фракцию промывали один раз, после чего надосадочные жидкости соединяли и центрифугировали 120 мин при 105 000 г (полученный осадок—микросомальная фракция, а надосадочная жидкость—растворимая фракция). Синаптосомальную фракцию получали также из цельного мозга крыс методом Хайоши (11).

ГС (12), ГТ (13) и γ -глутамилтрансферазную (14) активность определяли в гомогенате и во всех субцеллулярных фракциях мозга. Данные для ГС и ГТ выражали в микромолях образующейся γ -глутаминогидроксамовой кислоты на 1 г ткани и 100 мг белка при часовой инкубации. При определении γ -глутамилтранспептидазы инкубацию проводили в трис HCl буфере 0,1 М при pH 7,5, акцептором глутамильной группы служил глицилглицин. Данные выражали в микромолях образующегося p-нитротанилина на 1 г ткани и 100 мг белка при часовой инкубации. Белок определяли методом Лоури (15).

Хотя в литературе принято считать, что оптимальная pH для действия γ -глутамилтранспептидазы колеблется в пределах 8—9, в наших экспериментах мы пришли к выводу, что для γ -глутамилтранспептидазы мозга крыс pH 7,5 является оптимальной, что согласуется с исследованиями Лизы и Лодина (16), проведенными на ферменте из мозга мышей. Они нашли, что наибольшая активность фермента приходится на pH 6,5—7,5.

В таблице показано распределение активности ГС, ГТ и γ -глутамилтранспептидазы в гомогенате и субцеллулярных фракциях мозга. Наивысшая общая и удельная активность ГС и ГТ отмечается в растворимой фракции. В микросомальной и синаптосомальной фракциях общая и удельная активность ГС почти одинаковая. Однако удельная активность ГС в этих фракциях почти в три раза меньше, чем в растворимой фракции. Наименьшая удельная активность ГС наблюдается в ядерной и митохондриальной фракциях, что совпадает с литературными данными (2). Интересно отметить, что величина активности ГС синаптосомальной фракции в наших исследованиях (134 мкмоль/100 мг белка) совпадает с исследованиями Хамбергера (1) (114

мкмоль/100 мг белка), но она намного меньше той, которая была получена в исследованиях Варда и Брайфорда (1) для этой фракции (58 мкмоль/100 мг белка). Столь высокое значение активности ГС они приписывают предложенной ими модификации метода определения ГС (1).

Интересно отметить, что активность ГС растворимой фракции намного превышает таковую гомогената; выяснение этого несоответствия требует дальнейших исследований.

Параллельно с ГС определяли также γ -глутамилтрансферазную реакцию между глутамином и гидроксиламином в присутствии активаторов Mn^{2+} и АДР (образование γ -глутамилгидроксиамата). В литературе существуют разноречивые данные об идентичности ГС и ГТ. По данным Герцфельда активность указанных ферментов обусловлена различными белками: оба фермента в печени, печеночных опухолях, а также в тимусе по-разному реагируют на введение кортизона и тироксина. Кроме того, развитие активности этих ферментов в печени, почках, мозгу и мышцах происходит не одновременно. ГТ-активность в печени эмбриона и новорожденных повышается под действием тироксина, между тем ГС-активность не претерпевает изменений, т. е. активность ГС и ГТ не обусловлена одним и тем же белком (10), хотя исследователи (9) считают их идентичными.

Как видно из таблицы, распределение ГТ-активности в субцеллюлярных фракциях мозга совпадает с таковым ГС-активности, самую большую удельную активность ГТ проявляет в растворимой и микросомальной фракциях, ее активность в синаптосомальной фракции чуть ниже по сравнению с микросомальной фракцией, удельная активность ГТ в митохондриальной и ядерной фракциях, как и активность ГС, намного меньше, чем в остальных фракциях. Полученные нами данные об активности ГТ и ГС в разных субцеллюлярных фракциях мозга говорят, хотя и косвенно, в пользу идентичности этих двух ферментов. В таблице показано распределение γ -глутамилтранспептидазной активности в гомогенате и субцеллюлярных фракциях цельного мозга. γ -глутамилтранспептидаза проявляет самую большую активность в ядерной фракции, и примечательно, что ее общая активность превышает активность гомогената, причина которой остается неясной. Удельная активность γ -глутамилтранспептидазы митохондриальной, микросомальной и синаптосомальной фракций колеблется в одинаковых пределах (29, 33, 40), она чуть выше в синаптосомальной фракции, что дает нам основание думать, что обогащение активности при фракционировании в этой фракции не происходит за счет митохондриальной и микросомальной фракций.

По данным Майстера γ -глутамильный цикл может участвовать в регуляции белкового синтеза, обеспечивая его цистеином, внутриклеточное содержание которого весьма незначительно. В пользу этого предположения свидетельствуют данные Ченга о возрастании интенсивности транспептидазных процессов, катализируемых γ -глутамилтранспептидазой при регенерации печени (17).

Присутствие γ -глутамилтранспептидазной активности в синаптосо-

Глутаминсинтетазная, γ -глутамилтрансферазная и γ -глутамилтранспептидазная активность в гомогенате и субцеллюлярных фракциях мозга крыс, их мольч

	Глутаминсинтетазная активность		γ -глутамилтрансферазная активность		γ -глутамилтранспептидазная активность	
	на 1 г свежей ткани	на 100 мг белка	на 1 г свежей ткани	на 100 мг белка	на 1 г свежей ткани	на 100 мг белка
Гомогенат	33 ± 2.5	22 ± 1.5	245 ± 8.1	160 ± 4.4	25 ± 2.2	16 ± 0.9
Ядерная фракция	7.65 ± 1.1	15 ± 1.8	133.6 ± 1.4	262 ± 2.9	38 ± 3.2	76 ± 6
Митохондриальная фракция	0.49 ± 0.02	1.3 ± 0.06	49.5 ± 1.4	150 ± 4.8	9.5 ± 0.87	29 ± 2.2
Микросомальная фракция	4.04 ± 0.15	104 ± 3.4	27.2 ± 1.08	680 ± 26.1	1.32 ± 0.09	31 ± 2.1
Растворимая фракция	51.36 ± 1.4	327 ± 10.1	67.7 ± 2.5	424 ± 16.2	2.4 ± 0.2	15 ± 1.2
Синапсомембранная фракция	4.56 ± 0.2	134 ± 5.5	12.8 ± 0.6	410 ± 11.3	1.26 ± 0.08	40 ± 2.5

мальной фракции мозга наводит на мысль, что она играет определенную роль в нервной передаче. Наше предположение подтверждается исследованиями Майстера (17) о присутствии γ -глутамилтранспептидазы в специфических нейронах центральной нервной системы (мозжечковые клетки Пуркинье, клетки переднего рога спинного мозга). Известно также, что глутатион может вызывать специфическую поведенческую реакцию, обнаруженную в частности у *Hydra littoralis* (раскрытие ротового отверстия, движение щупальцев). Майстер считает, что глутатион мембран-связанной γ -глутамилтранспептидазой на рецепторной стороне мембраны может вызвать поведенческую реакцию, возможно, через γ -глутамильное производное, выполняющее роль нейротрансмиттора (17).

Проведенные нами исследования по определению активности ГС и ГТ в субцеллюлярных фракциях мозга крыс показали, что их распределение во всех фракциях почти одинаково, хотя уровень активности ГТ значительно превышает таковой ГС. Исключение составляет растворимая фракция, в которой удельная активность ГС и ГТ очень высока; особой разницы в их активности не наблюдается. В нашей предыдущей работе (18) было показано, что ГС и ГТ, очищенные из растворимой фракции мозга крыс, по своим свойствам отличаются от мембран-связанных ГТ и ГС, разработанный нами метод очистки не приемлем в отношении последних. Интересно отметить, что частично очищенная фракция глутамилсинтетазы и γ -глутамилтрансферазы, полученная нами из осадка (осадок содержит все субцеллюлярные фракции кроме растворимой), проявляет также γ -глутамилтранспептидазную активность, между тем как выделенный нами белок из растворимой фракции не обладает транспептидазной активностью. Известно также, что очищенные препараты γ -глутамилтранспептидазы (фермент известен как мембран-связанный белок) почек и печени обладают слабо выраженной γ -глутамилтрансферазной активностью (17). В наших исследованиях (таблица) мозговая γ -глутамилтранспептидаза показывает отличную от ГС и ГТ субцеллюлярную локализацию и по предварительным данным не обладает γ -глутамилтрансферазной—гидроксаматной активностью. Несмотря на то, что в наших исследованиях ГС, ГТ и γ -глутамилтранспептидаза обнаруживаются во всех субцеллюлярных фракциях мозга, хотя с разной степенью активности, вопрос идентичности белка, ответственного за эти три ферментативные активности, требует дальнейших исследований.

Институт биохимии
Академии наук Армянской ССР

γ -գլուտամինախլորանսպեպտիդազայի, գլուտամինսինթեթրազայի, γ -գլուտամինախլորանսֆերազայի ակտիվության տեղարաշխումը սուրցելուլյար ֆրակցիաներում

Ուսումնասիրվել է առնետի ուղեղի սուրցելուլյար ֆրակցիաներում (կոորիպային, միտոքոնդրիալ, միկրոսոմալ, լուծիլի և սինապտոսոմալ) γ -գլուտամինախլորանսպեպտիդազային, գլուտամինսինթեթրազային, γ -գլուտամինախլորանսֆերազային ակտիվությունների տեղարաշխումը: Պարզվել է, որ այդ երեք ակտիվությունները տարբեր մակարդակներով առկա են առնետի-ուղեղի գոլորուսումնասիրված ֆրակցիաներում: γ -գլուտամինախլորանսպեպտիդազային ակտիվության ներկայությունը սինապտոսոմալ ֆրակցիայում վկայում է նրա որոշակի դերի մասին ներվային հաղորդման մեջ:

ЛИТЕРАТУРА — ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

- ¹ A. Humberger, C. N. Cotman, A. Sellstrom, C. T. Weter, in: Dynamic Properties of glial cells (Scholteniels F., Franck C., Tower D. B. and Hertz L., eds), Pergamon Press, Oxford, 1978. ² H. F. Bradford, H. K. Ward, A. J. Thomas, J. Neurochem., vol. 30, 1453 (1978). ³ L. Salganicoff, E. De-Robertis, J. Neurochem., vol. 12, 287 (1965). ⁴ H. F. Bradford, H. K. Ward, Brain Res., vol. 110, 115 (1976). ⁵ C. J. Van Den Berg, D. Garfinkel, Biochem. J., vol. 123, 211 (1971). ⁶ R. Balazs, A. J. Patel, D. Richter, in: Metabolic Compartmentation in the Brain (Balazs R. and Chemer J. F. eds), Macmillan, London, 1973. ⁷ H. K. Ward, H. F. Bradford, J. Neurochem., vol. 33, 339 (1979). ⁸ S. S. Tate, A. Meister, J. Biol. Chem., vol. 250, № 12 (1975). ⁹ A. Lajtha, Mela H. W'aelsch, J. Biochem., vol. 205, № 2 (1953). ¹⁰ A. Herzfeld, N. A. Estes, Biochem. J. vol. 133, 59 (1973). ¹¹ F. Hajos, Brain Res., vol. 93, №3 (1975). ¹² O. Z. Sellinger, F. B. Vester, J. Biol. Chem., vol. 237, 2836 (1962). ¹³ V. P. Wellner, A. Meister, Biochemistry., vol. 5, 872 (1966). ¹⁴ M. Orłowski, A. Meister, J. Biol. Chem., vol. 240, 1, (1955). ¹⁵ O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, Randall R. J., J. Biol. Chem. vol. 193, 265 (1951). ¹⁶ L. Lisy, Z. Ložin, Collect. Czechosl. Chem. Commun., vol. 42, № 10 (1977). ¹⁷ А. Мәүітср, Вопросы биохимии мозга, вып. 14, Изд-во АН АрмССР, Ереван (1960). ¹⁸ Г. Х. Бунятчи и др., Вопросы биохимии мозга, вып. 14, Изд-во АН АрмССР, Ереван (1980).