

УДК 591.1.05

БИОХИМИЯ

Ж. С. Геворкян, А. С. Оганесян, К. В. Майсuryн

К вопросу регуляции активности ферментов, принимающих
участие в процессах деаминации некоторых
L-аминокислот в почечной ткани

(Представлено чл.-корр. АН Армянской ССР А. А. Галояном 29/XII 1982)

Многочисленные исследования, проведенные за последние годы, показали важную роль процессов фосфорилирования и дефосфорилирования ряда физиологически активных белков, в том числе и ферментов, в механизме регуляции их активности и метаболических процессов. Исследованиями ряда авторов (¹⁻³) установлено, что при фосфорилировании активность некоторых ферментов, как фосфоорилаза «b», щелочная фосфатаза и др., повышается, а других, как гликогенсинтетаза, пируватдегидрогеназа, дрожжевая глутаматдегидрогеназа и др., понижается (³⁻⁵). Обратное явление наблюдается при их дефосфорилировании. В процессах фосфорилирования белков активное участие принимают протеинкиназы. Циклически-аденозинмонофосфат (сАМФ)-зависимая протеинкиназа, о чем будет идти речь в настоящем сообщении, состоит из регуляторной и каталитической субъединиц. сАМФ, связываясь с регуляторной субъединицей, отщепляет ее от холофермента, в результате чего проявляется активность каталитической субъединицы, что приводит к усилению процессов фосфорилирования белков (⁶). В животных тканях обнаружен белковый ингибитор этого фермента (⁷). В литературе имеются также сообщения о тормозящем действии диамида (бис-диметиламид-азодикарбоксикислоты) на активность сАМФ-зависимой протеинкиназы (⁸). Содержание сАМФ в животных тканях регулируется активностью двух энзиматических систем: аденилатциклазной и сАМФ-фосфодиэстеразной. Первая из них катализирует образование сАМФ из АТФ, а вторая осуществляет его распад. Дефосфорилирование белков происходит при участии фосфопро-теинфосфатазы (ФПФ-аза). В зависимости от физиологического состояния живого организма активность протеинкиназы и ФПФ-азы изменяется, что приводит к соответствующим сдвигам в сторону усиления фосфорилирования или дефосфорилирования белков. Показано, что под действием адреналина, глюкагона, паратиреоидного, антидиуретического и других гормонов повышается активность сАМФ-зависимой протеинкиназы.

Ранее нами было установлено, что при повышении содержания АТФ в почечной ткани (инкубация срезов в условиях высокого парциального давления кислорода) усиливается связывание меченого фосфора $\gamma^{32}\text{-P-ATP}$ с почечными белками, что сопровождается повы-

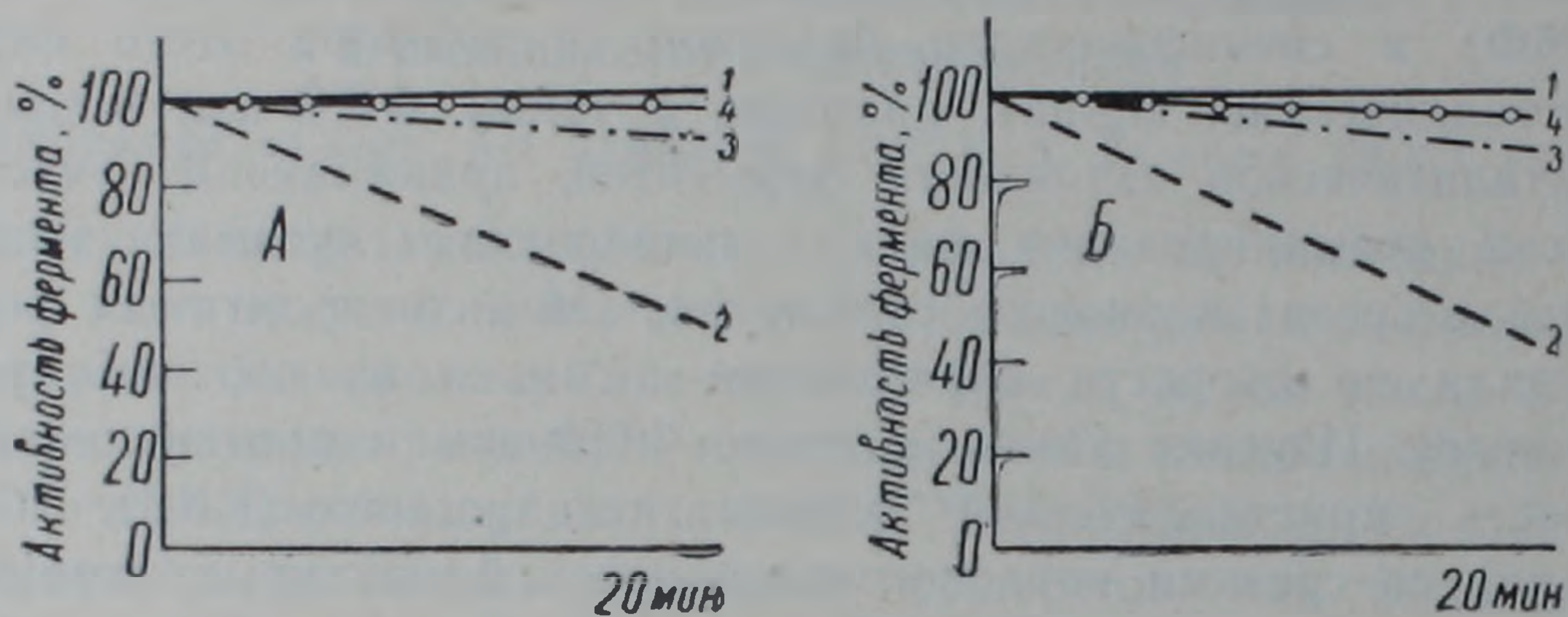
шением активности ферментов, осуществляющих деаминирование ряда L-аминокислот (глутамат, аспартат, орнитин). Обратное явление имеет место при понижении количества АТФ (инкубация срезов в условиях низкого парциального давления кислорода, в присутствии dI-этионина и обнаруженного нами сывороточного ингибитора (^{9, 10}). Результаты этих исследований дали нам основание высказать мнение о том, что активность ферментов, осуществляющих деаминирование указанных аминокислот, регулируется фосфорилированием и дефосфорилированием.

Имея в виду вышеизложенное, мы проводили ряд исследований по изучению действия активатора сАМФ-зависимой протеинкиназы (сАМФ) и специфического белкового ингибитора этого фермента (кристаллический, sigma), диамида, а также ФПФ-азы в проявлении каталитической активности ферментов, принимающих участие в процессах деаминирования ряда L-аминокислот (глутамат, аспартат, орнитин) в срезах коркового слоя почек. Об активности этих ферментов судили по скорости образования аммиака из соответствующих аминокислот. Изучали также влияние ФПФ-азы и протеинкиназы на активность кристаллической глутаматдегидрогеназы (ГДГ). Опыты проводили со срезами коркового слоя почек белых крыс, которые (по 100 мг) инкубировали в Кребс-Рингер-бикарбонатном буфере (2 мл) в течение одного часа при $t = 37^\circ$. На каждую пробу добавляли: аминокислоты — по 16 мкМ, протеинкиназу — 30 ед., ФПФ-азу — 1 мл элюат, белковый ингибитор протеинкиназы — 8 ед., диамид — 20 мкМ. Аммиак определяли микродиффузионным методом по Конве, с последующим колориметрированием после добавления реактива Несслера. Активность ГДГ определяли спектрофотометрическим методом Шмидта по изменению величины экстинкции при длине волны 340 нм. Почечная ФПФ-аза (из коркового слоя) почек белых крыс подвергалась частичной очистке по методу, описанному нами ранее (¹¹).

Как показывают результаты опытов, приведенные в табл. 1, добавленный к инкубируемой среде сАМФ в концентрации 10^{-4} М стимулирует деаминирование L-глутамата (на 23,3%), L-аспартата (на 33%) и L-орнитина (на 26,3%) в срезах коркового слоя почек. Эти данные дали нам основание считать, что сАМФ-зависимая протеинкиназа вовлекается в процессы деаминирования указанных аминокислот. В последующих опытах изучали действие ингибиторов этого фермента на деаминирование некоторых L-аминокислот.

Из данных табл. 1 видно, что под действием специфического белкового ингибитора протеинкиназы отмечается четкое подавление процессов деаминирования указанных аминокислот. Подобное явление наблюдается и в присутствии другого ингибитора этого фермента — диамида. Известно, что экстракт почечной ткани обладает высокой ФПФ-азной активностью, которая, принимая активное участие в процессах дефосфорилирования белков, в том числе и ферментов, оказывает регулирующее действие на их каталитическую активность. В связи с этим мы изучали действие указанного экстракта и препарата частично очищенной ФПФ-азы из почечной ткани (корковый слой) на деаминирование аминокислот в срезах почек. Как видно из табл. 2,

под действием как экстракта почек, так и частично очищенного препарата ФПФ-азы наблюдается выраженное подавление деаминирования аминокислот. На рисунке показаны изменения реаминирующей и деаминирующей активности кристаллической ГДГ под действием экстракта почек. Как видно экстракт почечной ткани подавляет активность ГДГ, причем это в более выраженной форме проявляется в отношении реаминирующей способности ГДГ. В присутствии протеникиназы сАМФ и АТФ подавляющий эффект экстракта в значительной мере снимается. После термообработки экстракта (выдержка при $t=96^{\circ}$ в течение 15 мин) его подавляющий эффект исчезает.



Влияние экстракта коркового слоя почек на активность глутаматдегидрогеназы: А—реаминирующая способность; Б—деаминирующая способность; 1—контрольный опыт; 2—действие нативного экстракта почек; 3—нативный экстракт почек+протеникиназа+сАМФ+АТФ; 4—действие термообработанного экстракта почек

Результаты исследований, приведенные в настоящем сообщении, говорят в пользу ранее высказанного нами мнения о том, что активность ферментов, принимающих участие в реаминировании L-глутамата, L-аспартата и L-орнитина, регулируются фосфорилированием и дефосфорилированием. Как было показано, сАМФ, действие которого осуществляется посредством влияния на протеникиназу и фосфорилирования белков, в том числе и ферментов, стимулирует процессы деаминирования вышеуказанных аминокислот в срезах почек. С другой стороны, подавление активности протеникиназы под действием соответствующих ингибиторов, в том числе и под действием специфического ингибитора этого фермента, приводит к торможению деаминирования указанных аминокислот. Подобный эффект наблюдается и под действием препаратов ФПФ-азы, которая осуществляет дефосфорилирование белков.

Ранее нами было установлено, что в условиях, приводящих к повышению содержания АТФ в почечной ткани, связывание меченого фосфата $\gamma^{32}\text{-P-ATP}$ с белками этой ткани возрастает, что сопровождается повышением активности ферментов, осуществляющих деаминирование глутаминовой, аспарагиновой кислот и орнитина. Обратное явление наблюдается при понижении содержаний АТФ и под действием фосфопротеинфосфатазы (усиление дефосфорилирования белков и снижение активности аминокислотдеаминирующих ферментов).

Таблица 1

Влияние активатора и ингибиторов сАМФ-зависимой протеинкиназы
на образование аммиака из некоторых L-аминокислот
в срезах коркового слоя почек
(средние данные из 6 опытов)

Условия опыта	Количество аммиака, мкмоль/г . ткани/ч		
	глутамат	аспартат	орнитин
Контроль	6,0 ± 0,8	10,6 ± 1,1	13,7 ± 1,3
+сАМФ	7,4 ± 0,3	14,1 ± 0,5	17,3 ± 0,9
+белковый ингибитор протеинкиназы	3,0 ± 0,2	6,0 ± 0,7	10,6 ± 0,8
+диамид	4,2 ± 0,5	6,3 ± 0,8	8,7 ± 1,1

Таблица 2

Влияние экстракта коркового слоя почек
и частично очищенной ФПФазы на образование аммиака из
L-аминокислот в срезах коркового слоя почек
(средние данные из 4 опытов)

Условия опыта	Количество аммиака, мкмоль/г . ткани/ч		
	глутамат	аспартат	орнитин
Контроль	6,1 ± 0,5	10,3 ± 1,2	12,3 ± 1,6
Срезы+экстракт коркового слоя почек	1,7 ± 0,1	5,5 ± 0,6	7,0 ± 0,9
Срезы+ФПФаза	0,8 ± 0,05	4,1 ± 0,5	5,9 ± 0,9

Интересные результаты были получены с кристаллической ГДГ. Фосфопротеинфосфатаза подавляет активность ГДГ, а сАМФ-зависимая протеинкиназа снимает этот эффект. В наших других исследованиях было установлено, что под действием ФПФ-азы из ГДГ отщепляется неорганический фосфат. Таким образом, на новом материале было показано, что в почечной ткани млекопитающих (белые крысы) активность ГДГ, а также ферментов, осуществляющих деаминирование L-аспартата и L-орнитина, регулируется фосфорилированием и дефосфорилированием, причем фосфорилирование приводит к повышению их активности, а дефосфорилирование—к снижению.

В физиологических условиях между фосфорилированием и дефосфорилированием ферментов (а также и других физиологически активных белков) существует кинетическое равновесие и соотношением их действия определяется степень активности этих ферментов (и физиологически активных белков).

**Երիկամային հյուսվածքում որոշ ամինաթթուների դեամինացման
պրոցեսներին մասնակցող ֆերմենտների ակտիվության կանոնավորման
հարցի շուրջը**

Ստացված տվյալները ցույց են տվել, որ ցիկլիկ ադենոզինմոնոֆոսֆատ-կախյալ պրոտեինկինազայի ակտիվատոր՝ ցիկլիկ ադենոզինմոնոֆոսֆատը խթանում է, իսկ այդ ֆերմենտի սպիտակուցային բնույթի սպեցիֆիկ ինհիբիտորը և դիամիդը ընդհակառակը, ճնշում են որոշ L-ամինաթթուների (գլուտամատ, ասպարտատ, օրնիտին) դեամինացումը սպիտակ առնետների երիկամային հյուսվածքում (կեղևային շերտ)։ Մյուս կողմից, երիկամի կեղևի էքստրակտը, որը հարուստ է ֆոսֆոպրոտեինֆոսֆատազայով և այդ ֆերմենտի մասնակի մաքրված պրեպարատը, որը իրականացնում է սպիտակուցների դեֆոսֆորացումը, ճնշում են վերոհիշյալ ամինաթթուների դեամինացման պրոցեսները։ Մաքուր (բյուրեղային) գլուտամատդեհիդրոգենազայի հետ կատարված փորձերը ցույց են տվել, որ երիկամի էքստրակտը զգալի չափով ճնշում է այդ ֆերմենտի ակտիվությունը, իսկ ավելացրած պրոտեինկինազան (ՍՏՖ-ի հետ միասին) կանխում է այդ արգելակումը։

Ստացված տվյալները հաստատում են նախկինում մեր կողմից արտահայտած այն տեսակետը, որ երիկամային հյուսվածքում վերոհիշյալ ամինաթթուների դեամինացմանը մասնակցող ֆերմենտների ակտիվությունը կանոնավորվում է նրանց ֆոսֆորացմամբ և դեֆոսֆորացմամբ, ընդ որում ֆոսֆորացումը նպաստում է նրանց ակտիվության բարձրացմանը, իսկ դեֆոսֆորացումը՝ իջեցմանը։

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

- ¹ J. T. Carney, R. J. Beynon, J. Kay e. o., Biochem. J., v. 175, 105 (1978).
- ² M. M. Ames, P. Lerner, W. Lovenberg, J. Biol. Chem., v. 253, 27 (1978). ³ E. C. Krebs, Ann. Rev. Biochem., v. 48, 923 (1979). ⁴ P. H. Sugden, P. J. Randle, Biochem. J., v. 173, 659 (1978). ⁵ B. A. Hemmings, J. Biol. Chem., v. 253, 5255 (1978) ⁶ E. G. Krebs, Curr. topics Cell Regul., v. 5, 99 (1972). ⁷ D. A. Walsh, C. D. Ashby, C. Gonzales, e. o., J. Biol. Chem., v. 246, 1977 (1971). ⁸ F. J. von Tersch, J. Mendicino, D. J. Pillon, Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 64, 433 (1975). ⁹ Ж. С. Геворкян, ДАН АрмССР, т. 69, 272 (1979). ¹⁰ А. Лайта, М. Шварц, Г. Сершен и др., ДАН АрмССР, т. 68, 50 (1979). ¹¹ Г. Х. Бунятыян, Ж. С. Геворкян, А. С. Оганесян и др., ДАН СССР, т. 261, 1006 (1981).