

УДК 514.764

С.П. ОГАНЕСЯН, М.А. ДАВТЯН, Л.Е. ЛАЧИНЯН, А.Р. ПАПОЯН

## АКТИВНОСТЬ ГЛУТАМАТ- И АЛАНИН-ДЕГИДРОГЕНАЗ В СУБКЛЕТОЧНЫХ ФРАКЦИЯХ ASP. NIGER R-3

Метод изопикнической сепарации субклеточных единиц *Asp. niger* R-3 в градиенте 0.5 М раствора сахарозы и 15% перколлы позволяет обнаружить реальную активность НАДН-ГДГ и НАДФН-ГДГ, НАДФН-АДГ, локализованную во фракции легких митохондрий и пероксисом.

Генерация и утилизация аммиака, несмотря на многочисленные исследования, все еще остаются предметом изучения как с точки зрения эволюционного становления осуществляющих их систем, так и понимания механизмов сопряжения с энергопотребляющими и производящими процессами.

Основные потоки азота в большинстве организмов объясняются механизмами трансдезаминирования и реаминирования [1-5].

Очевидно, оксидазы D-аминокислот играют существенную роль в процессе аммиакообразования из аминокислот лишь у немногих организмов, а в тканях животных они в этом отношении не могут играть подобную роль. Что же касается оксидазы D-аминокислот, то их присутствие в тканях животных является пока необъяснимым фактом [6, 7].

Однако структурно-функциональная организация этого процесса, его компартментализация на разных ступенях развития и в отдельных органах весьма многообразны и недостаточно ясны [8-10].

Если у животных картина внутриклеточного распределения ферментов деаминарования глутамата и аланина хорошо изучена, то этого нельзя сказать о микроорганизмах, в частности о грибах. С этой целью нами исследовалась активность ферментов глутамат-дегидрогеназы (НАД – ГДГ, НАДФ – ГДГ) и аланин-дегидрогеназы (НАД – АДГ, НАДФ – АДГ) в субклеточных фракциях *Asp. niger* R-3.

**Материал и методика.** Объектом исследования служил плесневой гриб *Asp. niger* R-3, полученный из Спитакского завода по производству лимонной кислоты. Методика выращивания и получения субклеточных частиц *Asp. niger* R-3 излагалась ранее [11].

Для определения ферментативной активности по реакции окисления НАДН и НАДФН в процессе восстановительного аминирования кетокислот 1 мл плесневого экстракта, содержащего 0.6-1 мг белка, инкубировался в присутствии кетокислоты (30 мкмоль), углекислого аммония (27 мкмоль) НАДН или НАДФН (2.5 мкмоль) при pH 7.4 (0.1 М фосфатный буфер); общий объем 3 мл. Ферментативную активность определяли по убыли НАДН или НАДФН (в процентах) оптической плотности при 340 нм (в спектрофотометре СФ-4, в кварцевой кювете с длиной оптического пути 1.0 см), характерной для восстановленных коферментов.

Контролями служили реакционные смеси, не содержащие кетокислот или аминокислот.

Активность митохондриального фермента сукцинатдегидрогеназы (КФ 1.3.9.9.1) определяли по методу Кернея и Синджера [12] и выражали в *мкмоль* 2,4-нодфенил-3,4-нитрофенил-5-фенилтетразолилхлорида на 1 *мл* экстракта, а микросомального фермента каталазы (КФ 1.4.3.3.) – по методу Кришнаканты и Рамакришны [13] и выражали в *мкмоль* пероксида на 1 *мл* экстракта. Оксидазу D-аминокислот (КФ 1.4.3.3.) определяли по методу Баудуина и др. [14] и выражали активность в *мкмоль* образовавшихся кетокислот на 1 *мл* экстракта, в качестве субстрата использовали D-метионин,  $\beta$ -N-ацетил-D-глюкозаминидазу (КФ 3.2.1.30) – по методу Баррета, активность выражали в *мкмоль* нитрофенола на 1 *мл* экстракта. Белок определяют по методу Лоури [16].

**Результаты и обсуждение.** Анализируя активность (табл. 1) сукцинатдегидрогеназы в качестве маркерного фермента митохондриальной фракции, можно прийти к выводу, что во фракциях I и II содержатся митохондрии. Исходя из активности маркерных ферментов пероксисом, можно заключить, что каталаза и оксидаз D-аминокислот сосредоточены в III и IV фракциях. Активность лизосомального фермента  $\beta$ -N-ацетил-D-глюкозаминидазы обнаружена во всех фракциях.

Таблица 1

*Локализация маркерных ферментов субклеточных частиц в градиенте 0.5 М раствора сахарозы и 15% перколлы*

Фракции	Ферменты (в %)				
	Белок, в <i>мг</i>	Сукцинатдегидрогеназа	Каталаза	Оксидаз D-аминокислот	$\beta$ -N-ацетил-D-глюкозаминидаза
бесклеточный экстракт	3.0	100	100	100	100
I	0.3	74	8	1	3
II	0.5	1	4	8	26
III	1.0	9	45	34	20
IV	0.9	0	57	35	40

Данные табл. 2 показывают, что после ультрацентрифугирования первоначального гомогената *Asp. Niger R-3* активность НАДН-ГДГ во фракции митохондрий составляет 20%, а во фракции легких митохондрий и пероксисом сосредоточена наибольшая активность данного фермента (43%). Активность НАДФН-ГДГ в митохондриях составляет 8%, а в пероксисомах и легких митохондриях – 32%. Полное отсутствие активности в цитозоле дает основание предположить, что данный фермент (НАДН-ГДГ) локализован в пероксисомах.

Таблица 2

*НАДН, НАДФН-ГДГ-азные, НАДН-, НАДФН-АДГ-азные активности в субклеточных фракциях *Asp. Niger R-3*, выделенных посредством ультрацентрифугирования*

Фракции	Активность фермента в <i>мкмоль</i> НАДН и НАДФН в 1 <i>мл</i> надосадка									
	белок	НАДН-ГДГ	%	НАДФН-ГДГ	%	белок	НАДН-АДГ	%	НАДФН-АДГ	%
гомогенат (700g)	5.6	2.1	100	2.4	100	4.0	2.8	100	4.0	100
недостаток (3300g)	4.3	1.5	71	2.0	86	3.2	2.5	90	2.6	65
митохондрий	0.9	0.42	20	0.18	8	0.6	0.1	3	1.4	35
надосадок (25000g)	2.1	0.76	35	1.4	58	2.0	0.88	32	0.8	20
легкие митохондрии, лизосомы, пероксисомы	1.7	0.92	43	0.7	30	0.8	1.4	50	1.5	38
надосадок (100000g)	0.3	0	–	–	–	0.3	0	–	–	–

При сравнительном изучении уровня активности НАДН-ГДГ, НАДФН-ГДГ было выяснено, что соотношение активности НАДН-ГДГ в пероксисомах и в митохондриях составляет 2:1, а для НАДФН-ГДГ – 4:1.

Вышеуказанное соотношение уровня активности этих ферментов приводит к заключению, что активность НАДН-ГДГ и НАДФН-ГДГ во фракции пероксисом больше, чем во фракции митохондрий.

НАДН-АДГ *Asp. Niger* R-3, осуществляющая прямое аминирование пирувата в цитоплазматической фракции, также проявляет низкий уровень активности в митохондриях (3%) и значительно выше во фракции легких митохондрий и пероксисом (50%). Активность НАДН-АДГ в основном проявляется как во фракции митохондрий (35%), так и во фракции пероксисом, связанных с легкими митохондриями (38%). Соотношение активности пероксисом и митохондрий для НАДН-АДГ составляет 15:1, а для НАДФН-АДГ – 1:1.

Данные табл. 3 представляют результаты серии экспериментов с использованием метода изопикнической сепарации в градиенте 0.5 М сахарозы и 15% перколла. Выявляется высокая активность для НАДН-ГДГ в митохондриях (30%) и еще более высокая в пероксисомах (52%), а в отношении НАДН-АДГ в этих фракциях активность составляет 15 и 59% соответственно.

Таблица 3

НАДН-ГДГ-азная и НАДН-АДГ-азная активности субклеточных фракций *Asp. Niger* R-3, выделенных посредством изопикнической сепарации в градиенте 0.5 М раствора сахарозы и 15% перколла

Фракции	Активность фермента в мкмоль НАДН в 1 мл надосадка				
	белок	НАДН-ГДГ	%	НАДН-АДГ	%
надосадок (700 г)	7.8	2.36	100	2.2	100
I – крупные митохондрии	1.0	0.7	30	0.32	15
II – легкие митохондрии, лизосомы, пероксисомы	0.9	0.9	40	1.1	50
III – пероксисомы, лизосомы	2.8	1.2	52	1.3	59
IV – цитозоль	2.6	0	–	6	–

В отношении НАДН-АДГ нам удалось выявить незначительную активность этого фермента в экспериментах, полученных путем ультрацентрифугирования во фракции митохондрий, тогда как при изопикнической сепарации данный фермент проявлял активность в 5 раз выше в указанных фракциях.

Полученные данные дают возможность заключить, что метод изопикнической сепарации позволяет обнаружить реальную активность как НАДН-ГДГ, так и НАДН-АДГ, ранее приписываемую так называемой “цитоплазматической фракции”, на самом же деле локализованной во фракции легких митохондрий и пероксисом.

В исходном экстракте и в изучаемых субклеточных фракциях, полученных при ультрацентрифугировании и при изопикнической сепарации в градиенте 0.5 М раствора сахарозы и 15% перколла, нам не удалось обнаружить реакции окислительного дезаминирования L- глутамата и L-аланина.

Вышеприведенные данные позволяют заключить, что метод изопикнической сепарации сохраняет целостность мембран и микроокружения клеточных субъединиц, выявляет реальный уровень активности ферментов и их локализацию на субклеточном уровне.

Кафедра биохимии

Поступила 25.06.1997

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Браунштейн А.Е., Бычков С.М. Бесклеточная ферментная модель дегидразы L-аминокислот (L-дезаминазы). - Биохимия, 1940, N 5, с. 337-359.
2. Браунштейн А.Е., Азарх Р.М. О механизме дезаминирования аминокислот в тканях печени и почек. - Биохимия, 1944, N 9, с. 260-270.
3. Буятыев Г.Х., Мовсесян С.Г. Дезаминирование и реанимирование НАД-ов в мозговой ткани. - Вопросы биохимии мозга, 1966, N3, с. 5-21.

4. Olson J.A., Anfinsen C.B. The crystallization and characterization of L-glutamic acid dehydrogenase.- J. Biol. Chem., 1952, N 97, p. 67-80.
5. Браунштейн А.Е., Крицман М.Г. Образование и распад аминокислот путем интермолекулярного переноса аминогруппы.- Биохимия, 1937, N 2, p. 242-259.
6. Blanchard, Green A.E. L-aminoacid oxidase in animal tissue.- J. Biol. Chem., 1944, v. 155, p. 421-440.
7. Майстер А. Биохимия аминокислот. М.: 1961, с. 184-190.  
Багдасарян Е.Г., Давтян М.А. Взаимоотношение D и L-стереоизомеров валина и лейцина при их усвоении дрожжами *Candida guillieni* ВКМ У-42.- Биол. ж. Армении, 1987, т. 40, N 7, с. 579-583.
9. Давтян М.А., Атавесьян М.Б., Лачинян Л.Е. Синтез аминокислот из аммиака и дикарбоновых кислот в гомогенате дрожжей *Candida guilliermondii* ВКМ У-42.- Биол. ж. Армении, 1975, т. 28, N. 2, с. 10.
10. Оганесян С.П., Бабаян А.Г. Влияние стереоизомеров аминокислот на активность оксидазы D-аминокислот *Asp. niger* R-3.- Биол. ж. Армении, 1990, т. 43, N 6, с. 110-113.
11. Оганесян С.П., Давтян М.А., Хавдога Я. Энцимологическое исследование *Asp. niger* R-3.- Биохимия, 1990, т. 55, с. 2221-2225.
12. Kearney E.B., Singer Th. P. - J. Biol. Chem., 1965, v. 219, N 2, p. 963-975.
13. Krishnakantha J.R., Ramakrishna Kurup. C.K.- Biochem. J., 1972, v. 130, p. 167.
14. Baudhuin P., Beaufay H., Rahman L.J., Sellinger O., Wattiaux R., Jacques P., De Duve. - Biochem. J., 1964, v. 92, p. 179-184.
15. Barret A.J.- J.J.C. Dingle North-Holland, 1972, p. 46-135.
16. Lowry O.M., Rossbrough N.J., Farr A.J., Randall R.J. - J. Biol. Chem., 1951, v. 193, p. 265-275.

Խ.Պ. ՀՈՎՀԱՆՆԻՍՅԱՆ, Մ.Ա. ԴԱՎԹՅԱՆ, Լ.Ե. ԼԱՉԻՆՅԱՆ, Ա.Ռ. ՊԱՊՈՅԱՆ

ԳԼՅՈՒՏԱՄԻՆԱԹԹՎԻ ԴԵՀԻԴՐՈԳԵՆԱԶԻ ԵՎ  
ԱԼԱՆԻՆ-ԴԵՀԻԴՐՈԳԵՆԱԶԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅՈՒՆԸ *ASP. NIGER* R-3-ի  
ԵՆԹԱԲՋՁԱՅԻՆ ՖՐԱԿՑԻԱՆԵՐՈՒՄ

Ա մ փ ո փ ո մ

Իզոպիկնիկ անջատման մեթոդով 0.25 M սախարոզի և 15% պերկովի գրադիենտում հնարավոր է հայտնաբերել մանր միտոքոնդրիումներում և պերօքսիսոմներում տեղաբաշխված գլյուտամինաթթվի դեհիդրոգենազի և պլանին-դեհիդրոգենազի իրական ակտիվությունը: