

Член-корреспондент АН СССР В. Л. КРЕТОВИЧ, Г. Ш. ТКЕМАЛАДЗЕ,
Т. И. КАРЯКИНА, Е. А. РОМАНОВА, Л. И. СИДЕЛЬНИКОВА

РЕГУЛЯЦИЯ ДЕЙСТВИЯ РАСТИТЕЛЬНОЙ ГЛЮТАМАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ IN VIVO

Ранее нами было показано (1), что инфильтрация фосфата аммония в корни гороха индуцирует синтез НАД- и НАДФ-специфичных глютаматдегидрогеназ, активность которых учитывалась по восстановительному аминированию α -кетоглутаровой кислоты. В связи с этим нам казалось интересным изучить влияние ионов аммония, глютаминовой кислоты и глютамина на синтез НАД- и НАДФ-специфичных глютаматдегидрогеназ, активность которых определялась как по восстановительному аминированию α -кетоглутаровой кислоты, так и по окислительному дезаминированию глютаминовой кислоты.

Объектом исследования служили цельные проростки 5—6-дневных растений гороха сорта Победитель.

Реактивы: α -кетоглутаровая кислота и $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, отечественного производства, глютамат натрия фирмы «Adjinomoto», глютамин фирмы «California biochemical corporation»; НАД- H_2 фирмы «Cyclo chemical corporation»; НАДФ- H_2 фирмы «Boehringer», актидион фирмы «Light».

Введение в корни цельных проростков гороха 0,025 М $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 0,05 М глютаминовой кислоты; 0,05 М глютамина, а также смесей: $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ + глютаминовая кислота, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ + актидион (50 μg /мл), глютаминовая кислота + актидион и глютамин + актидион — производили методом вакуум-инфильтрации.

В качестве контроля инфильтрировали воду и 0,025 М К, Na-фосфатный буфер рН 7,8. Влияние инфильтрированных веществ определяли после экспозиции инфильтрированных корней на рассеянном свете в течение 5 час. По окончании экспозиции отделяли одинаковое количество корней от проростков, промывали дистиллированной водой и использовали для получения ферментных экстрактов. Для получения гомогенатов корни замораживали сухим льдом, растирали и заливали водой в соотношении 1 : 2. Гомогенат фильтровали через 4 слоя марли и центрифугировали при 340 g для удаления грубых обломков клеток, ядер, крахмальных зерен. Надосадочную жидкость диализовали против воды в течение 24 час. при 2°, а затем центрифугировали при 22 000 g в течение 30 мин. Надосадочную жидкость использовали в качестве ферментного экстракта.

Глютаматдегидрогеназную активность определяли спектрофотометрическим методом. В случае восстановительного аминирования α -кетоглутаровой кислоты реакционная смесь содержала: 0,25 мл ферментного экстракта; 0,1 мл раствора α -кетоглутаровой кислоты (2,92 мг), 0,1 мл НАД- H_2 или НАДФ- H_2 (0,2 мг) и 0,066 М фосфатный буфер рН 8,5 до общего объема 3 мл; в опытную кювету добавляли 2 капли 3,7 М $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. При изучении влияния ингибитора белкового синтеза — актидиона на активность глютаматдегидрогеназы в реакционную смесь добавляли 0,05 мл раствора актидиона (0,15 мг), который предварительно инкубировали в течение 5—10 мин. с ферментным экстрактом. В случае окислительного дезаминирования глютаминовой кислоты реакционная смесь содержала: 1 мл ферментного экстракта, 0,1 мл глютаминовой кислоты (2,9 мг), 0,1 мл НАД⁺ (0,2 мг), 1,8 мл 0,066 М фосфатного буфера рН 8,5. За единицу активности прини-

мали количество фермента, которое вызывало изменение оптической плотности при 340 мμ на 0,001 за 1 мин. Удельную активность рассчитывали как число единиц фермента на 1 мг белка ферментного экстракта. Белок определяли по Лоури.

Как видно из табл. 1, введение в корни $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ индуцирует синтез как НАД-, так и НАДФ-специфичной глутаматдегидрогеназы.

Таблица 1

Влияние инфильтрированных соединений на аминирующую активность НАД- и НАДФ-специфичных глутаматдегидрогеназ в диализованном экстракте

Инфильтрированные соединения	Удельная активность	
	с НАД-Н	с НАДФ-Н ₂
Вода	444	62
К, Na-фосфатный буфер	440	60
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	816	140
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ + актидион	400	64
Глутаминовая кислота	435	—
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ + глутаминовая кислота	816	—
Глутамин	400	—
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ + актидион + глутаминовая кислота	400	—

Таблица 2

Влияние инфильтрированных соединений на дезаминирующую активность НАД-специфичной глутаматдегидрогеназы в диализованных экстрактах

Инфильтрированные соединения	Удельная активность
Вода	16
К, Na-фосфатный буфер	16
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	16
Глутаминовая кислота	21
Глутаминовая кислота + актидион	16
Глутамин	30
Глутамин + актидион	17

Индукция, о которой мы судим по возрастанию удельной активности в диализованном экстракте, выявлялась несмотря на то, что при введении в корни NH_4^+ усиливался синтез белка (содержание белка в диализованном экстракте после инфильтрации NH_4^+ и воды или К, Na-фосфатного буфера составляло 0,735 и 0,675 мг/мл соответственно). Как видно из табл. 1, индукция фермента под влиянием NH_4^+ действительно сопровождалась синтезом белка *de novo*, поскольку одновременное с NH_4^+ введение в корни ингибитора белкового синтеза — актидиона предотвращало индукцию фермента и синтез белка (в диализованном экстракте после инфильтрации актидиона вместе с NH_4^+ содержалось 0,600 мг белка на 1 мл). Специальными опытами было показано, что актидион на скорость восстановительного аминирования α-кетоглутаровой кислоты *in vitro* не влияет.

При рассмотрении табл. 2 видно, что после инфильтрации глутаминовой кислоты и глутамина удельная активность глутаматдегидрогеназы, определенная по окислительному дезаминированию глутаминовой кислоты, также увеличивается. Инфильтрация ионов аммония в данных условиях не сказывается на скорости окислительного дезаминирования глутаминовой кислоты.

Таким образом, в корнях проростков гороха NH_4^+ является субстратным индуктором как НАД-, так и НАДФ-специфичной глутаматдегидрогеназы, увеличивающим скорость синтеза глутаминовой кислоты. Глутаминовая кислота и глутамин также вызывают индукцию НАД-специфичного фермента, повышая скорость прямой реакции — окислительного дезаминирования глутаминовой кислоты.

Поступило
19 VI 1969

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

¹ В. Л. Кретович, Т. И. Карякина, Г. Ш. Ткемаладзе, Изв. АН СССР, сер. биол., № 5, 759 (1969).