

Т. Я. ЗАРОБЯН, А. Х. АГАДЖАНЫН, М. А. ДАВТЯН

ПУТИ КАТАБОЛИЗМА АРГИНИНА У АЭРОБНЫХ ИНФУЗОРИИ *PARAMECIUM MULTIMICRONUCLEATUM*

Установлено, что катаболизм аргинина у инфузорий *P. multimicronucleatum* осуществляется как аргиназой, так и аргининдеиминазой. Орнитиновый цикл у этих инфузорий отсутствует. При фракционировании аргиназы обнаружены два пика. Субстратная индукция фермента приводит к резкому повышению активности изофермента, индуцируемого с высокомолекулярными белками, а активность второго пика остается почти на прежнем уровне.

В настоящее время является общеизвестным существование в природе двух форм аргиназ: одна—уреотелическая, которая встречается лишь у уреотелических организмов и участвует в механизме нейтрализации аммиака, другая—неуреотелическая, которая имеет очень широкое биологическое распространение, в эволюционном отношении является древним ферментом и не связана с циклом мочевинообразования.

Доказывается наличие неуреотелической аргиназы во внепеченочных органах уреотелических животных и даже совместное присутствие обеих форм в печени уреотелических организмов [1].

Предполагается, что неуреотелическая аргиназа может лимитировать содержание в тканях аргинина, цитруллина, мочевины и однозамещенных гуанидиновых соединений, избыточное содержание или отсутствие которых нарушает метаболизм клетки [2, 3]. Возможно также участие этой аргиназы в биосинтезе гистонов в ядрах клетки путем лимитирования содержания аргинина [2, 3]. В некоторых организмах, по-видимому, аргиназа функционирует в направлении обеспечения необходимым субстратом (орнитином) биосинтеза пролина и глутамата [4—6].

Пути биосинтеза и катаболизма аргинина у инфузорий изучены весьма недостаточно. Имеются указания, что у инфузорий *Tetrahymena pyriformis* аргинин катаболизируется аргининдеиминазой [7], у *Clostridium botulinum* [8], наряду с аргининдеиминазным, обнаружен также трансимидиназный путь распада аргинина.

Целью данной работы являлось изучение наличия орнитинового цикла и путей катаболизма аргинина у аэробных инфузорий *P. multimicronucleatum*, исследовались также субстратная индукция и изоэнзимный спектр аргиназы.

Материал и методика. Объектом исследования служили свободноживущие инфузории *P. multimicronucleatum*, которые выращивались на салатной среде, описанной нами ранее [9]. Инфузории гомогенизировались в 0,1 М калий фосфатном буфере,

pH 7,2, в стеклянном гомогенизаторе типа Поттер-Эльведжема. Аргиназная активность определялась в препаратах путем инкубирования их при 37°C в течение 60 мин (0,2 М глициновый буфер, pH 9,5) в присутствии L-аргинина (50 мкмоль) и $MnCl_2$ (5 мкмоль) с последующим определением образовавшейся мочевины уреазным методом [10]. При фракционировании аргиназы применялся быстрый метод определения мочевины по Арчибальду [11].

Аргининдегидрогеназная активность определялась по методу Огинского [12]. Инкубационная смесь содержала 100 мкмоль L-аргинина (pH 9,3), 200 мкмоль глицината натрия (pH 9,3) и гомогенат инфузорий. Общий объем смеси—3 мл. После 30 мин инкубации при 37°C реакция приостанавливалась 0,3 мл 60% $HClO_4$ и определялось количество аммиака микродиффузионным методом Зелингсона в модификации Силанковой и др. [10].

Синтез цитруллина изучали в условиях, описанных Браунштейном и сотр. [13]. Цитруллин определяли калориметрическим методом Арчибальда, активность аргининосукцинатсинтетазы и аргининосукциназы—методом Ратнера [14], белок—по Лоури и др. [15].

Фракционирование экстракта инфузорий (25,00×g) проводили на колонке с сефадексом G-200 (1,5×4,5 см). На колонку наносили 3,5 мл надосадочной жидкости.

Результаты и обсуждение. С целью выявления наличия или отсутствия орнитинового цикла у инфузорий указанного вида нами исследовались отдельные ферментативные реакции этого цикла. В качестве дополнительного метода определения орнитинтранскарбамилазы был проведен арсенолиз цитруллина (доказано, что этот процесс катализируется орнитинтранскарбамилазой [16]). Для этого гомогенат инкубировался в течение 1 часа в арсенатном буфере (0,5 мм. pH 7,1) в присутствии цитруллина (100 мкмоль), после чего определялось количество отщепившегося аммиака (табл. 1).

Таблица 1
Ферменты орнитинового цикла у инфузорий, мкмоль/час/мг белка

Карбамил-фосфатсинтетазы и орнитинтранскарбамилазы	Арсенолиз цитруллина	Аргининосукцинатсинтетазы и аргининосукциназы	Аргиназа
0	0	0,14	0,46
0	0	0,13	0,44
0	0	0,13	0,44
0	0	0,12	0,48
$M \pm m$ 0	0	$0,13 \pm 0,018$	$0,45 \pm 0,01$

Нами изучалась также возможность биосинтеза цитруллина из CO_2 , NH_3 и АТФ в присутствии Mn^{2+} и глутамата, т. е. одновременно определялись активности карбамилфосфатсинтетазы и орнитинтранскарбамилазы. Однако у изучаемых инфузорий определить активность названных ферментов не удалось.

Данные табл. 1 показывают, что инфузории *P. multimicronucleatum* обладают некоторой активностью биосинтеза аргинина из аспартата, цитруллина и АТФ. Полученные данные свидетельствуют также о том, что инфузории обладают значительной активностью аргиназы.

Таким образом, нам удалось доказать наличие у изучаемых видов инфузорий аргининосукцинатсинтетазы, аргининосукциназы и аргиназы.

Мы изучали также аргининдеиминазную активность у инфузорий *P. multimicronucleatum*. Активность данного фермента определялась при pH 7,0. Приведенные в табл. 2 данные показывают, что инфузо-

Таблица 2
Активность аргининдеиминазы у инфузорий

мкм/час/мг белка

0,231
0,198
0,186
0,186
0,228

$M \pm m$ 0,206 $\pm$ 0,01

рии *P. multimicronucleatum* обладают некоторой активностью аргининдеиминазы. Таким образом, распад аргинина у этих инфузорий может протекать параллельно как аргиназным, так и деиминазным путем.

Для выявления изоферментов аргиназы мы проводили фракционирование экстракта инфузорий методом гель-фильтрации на колонке с сефадексом G-200. Результаты исследований представлены в виде кривых (рис. 1).

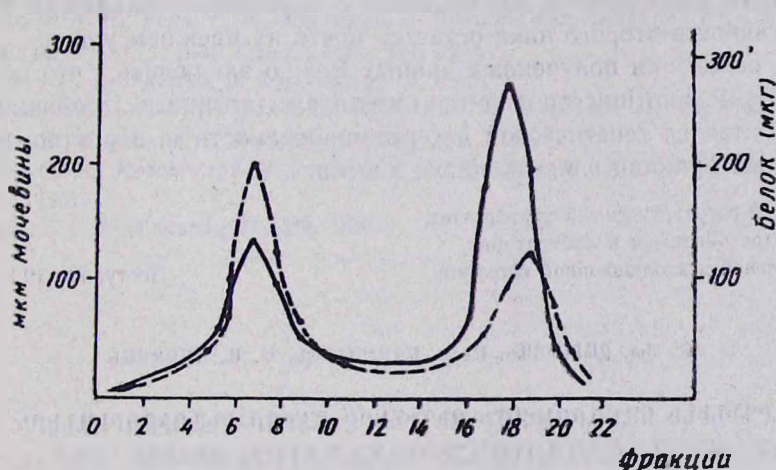


Рис. 1. Фракционирование экстракта инфузорий.

— — — белок, — — — активность аргиназы (мкм) мочевины на 1 мл фракции.

При фракционировании экстракта мы обнаружили четко разграниченные два пика аргиназной активности. Максимум первого пика находится во фракциях 7 и 8, а второго — 17 и 18, причем активность второго пика значительно превышает активность первого.

При исследовании возможности субстратной индукции аргиназы инфузорий установлено (рис. 2), что при инкубации инфузорий в среде, содержащей аргинин (2 г на 1 литр среды), наблюдается увеличение

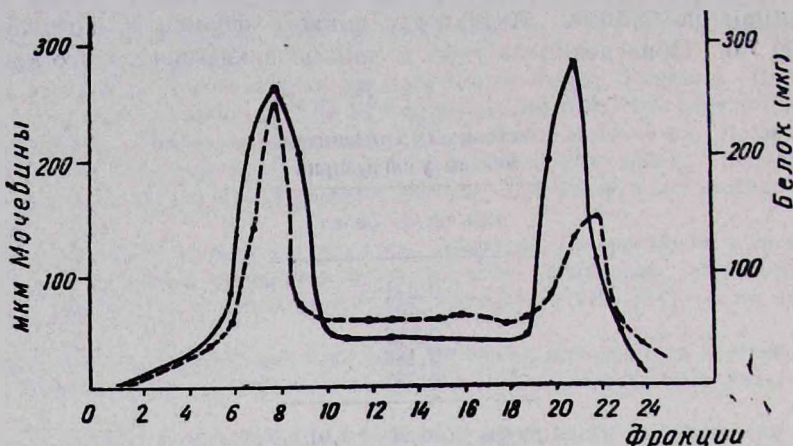


Рис. 2. Фракционирование индуцированного экстракта инфузорий.
— — — белок, ——— активность аргиназы (мкм) мочевины на 1 мл фракции.

активности почти в два раза по сравнению с таковой у инфузорий, выросших на среде без аргинина.

Далее проводилось фракционирование аргиназы экстракта инфузорий, предварительно подверженного субстратной индукции. Из рис. 2 видно, что после субстратной индукции происходит резкое повышение активности изофермента, элюируемого с высокомолекулярными белками, активность второго пика остается почти на прежнем уровне.

На основании полученных данных можно заключить, что обнаруженные у *P. multimicronucleatum* изоэнзимы аргиназы, по-видимому, различаются по генетической детерминированности и, вероятно, имеют различные функции в метаболизме клетки.

Ереванский государственный университет,
кафедра биохимии и лаборатория
сравнительной и эволюционной биохимии

Поступило 19.I 1976 г.

Р. Յա. ԶԱՐՈԲՅԱՆ, Ա. Խ. ԱԳԱԶՅԱՆ, Մ. Ա. ԴԱՎԻՅԱՆ

ԱՐԳԻՆԻՆԻ ԿԱՏԱՐՈՒԶՄԻ ՈՒՂԻՆԵՐԸ ԱԷՐՈՐ ԻՆՖՈՒԶՈՐԻԱՆԵՐԻ
PARAMECIUM MULTIMICRONUCLEATUM ՏԵՍԱԿԻ ՄՈՏ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Ուսումնասիրվել է արգինինի կատարուիզմի ուղիները աէրոբ ինֆուզորիաների մոտ: Հաստատվել է, որ արգինինի ճեղքումը ընթանում է ինչպես արգինազային, այնպես էլ արգինինդեհիմնազային ճանապարհով: Հետազոտվել են նաև օրնիտինային ցիկլի ֆերմենտները նշված ինֆուզորիաների

մոտ: Այդ ջիկլի ֆերմենտներից առկա են արգինինոսուկցինատսինթետազան, արգինինոսուկցինազան և արգինազան:

Ինֆուզորիաների մզվածքը՝ հել-ֆիլտրացիայի ճանապարհով ենթարկվել է ֆրակցիոն բաժանման: Հալտնաբերվել է արգինազայի ակտիվության երկու պիկ: Ընդորում երկրորդ պիկի ակտիվությունը զգալիորեն գերազանցում է առաջինի ակտիվությանը:

Արգինազայի իզոֆերմենտները սուբստրատային ինդուկցիայի ենթարկելիս նկատվել է, որ արգինազային ակտիվությունը բարձրանում է մոտ երկու անգամ: Սուբստրատային ինդուկցիայի ենթարկված մզվածքը ֆրակցիոն բաժանման ենթարկելիս բարձրանում է այն իզոֆերմենտի ակտիվությունը, որը միալուծվում է բարձրամոլեկուլյար սպիտակուցների հետ, իսկ երկրորդ պիկի ակտիվությունը համարյա պահպանվում է նախկին մակարդակի վրա:

ЛИТЕРАТУРА

1. Davtian M. A., Bunatun H. Ch. J. Neurochemistry, 13, 743, 1967.
2. Давтян М. А., Бунятян Г. Х., Геворкян Д. М., Бабоян Р. С., Петросян Л. А. Тез. II Всесоюзн. биохим. съезда, Ташкент, 1969.
3. Давтян М. А. Сб. Вопросы биохимии мозга, 4, 237, Ереван, 1968.
4. Агиджанян А. Х., Давтян М. А. Биологический журнал Армении, 27, 5, 19, 1974.
5. Mephan T. B., Linzell J. L. Nature, 214, 507, 1967.
6. Ilp M. C. M., Knox W. E. Biochem. J. 127, 893, 1972.
7. Hill L. J., Chambers P. Biochim. Biophys. Acta, 448, 435, 1967.
8. Milruka B. M., Costilow R. N. J. Bacter., 93, 295, 1967.
9. Агиджанян А. Х., Заробян Т. Я., Давтян М. А. Биологический журнал Армении, 28, 5, 30, 1975.
10. Силикова А. И., Трущ Г. Н., Являкова А. Вопросы мед. химии, 8, 588, 1962.
11. Archibald R. M. J. Biol. Chem., 1956, 121, 1944.
12. Oginsky E. L. Methods in Enzymology, 2, 1955.
13. Браунштейн А. Б., Северина И. С., Бабская Ю. Е. Биохимия, 21, 738, 1956.
14. Ratner S., Pappas A. J. Biol. Chem. 179, 1199, 1949.
15. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randle R. J. J. Biol. chem., 193, 265, 1951.
16. Reichard P. Acta scand., 11, 523, 1957.