

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

## ИНГИБИРОВАНИЕ АРГИНАЗЫ НЕКОТОРЫМИ АМИНО- КИСЛОТАМИ В БЕСКЛЕТОЧНЫХ ЭКСТРАКТАХ ИНФУЗОРИЙ (*PARAMESCIUM MULTIMICRONUCLEATUM*)

Изучалось ингибирующее влияние некоторых аминокислот на аргиназную активность инфузорий. Установлено, что сильное ингибирующее влияние на аргиназную активность инфузорий оказывают L-орнитин и L-пролин. Причем L-пролин, ГАМК и L-лизин являются конкурентными ингибиторами, а пролин—неконкурентным. Определены константа Михаэлиса ( $K_m$ ) и константа ингибирования ( $K_i$ ) для аргиназы инфузорий.

В последнее время выдвинуто положение о существовании в природе двух форм аргиназ—уреотелической, участвующей в цикле мочевинообразования, и неуреотелической, которая не участвует в механизмах нейтрализации аммиака и имеет другие, пока не установленные функции. Вероятно, неуреотелическая аргиназа лимитирует в тканях содержание мочевины, аргинина и других гуанидиновых соединений, которые обладают биологической активностью [4, 5]. Предполагается также возможное участие ее в биосинтезе гистонов в ядрах клеток [4, 5].

Имеются данные [12, 31], свидетельствующие о наличии связи между процессами биосинтеза пролина, глутамата и аргиназной активностью: Мора и сотр. [26] показали, что у *Neurospora crassa*, а также у мексиканского аксолотля до метаморфоза синтезируется аргинин, но он не гидролизуется в мочевины, хотя и содержит аргиназу. Авторы пришли к выводу, что аргиназа, вероятно, не связана с орнитинным циклом и функционирует с целью обеспечения орнитинном процесса биосинтеза пролина и глутамата [1, 21, 31].

Показано, что в молочной железе крыс в течение лактации повышается аргиназная активность [2, 3]. Авторы при этом выявили коррелятивную зависимость между активностью аргиназы и орнитин-δ-трансаминазы. Подобная закономерность установлена также и в жировом теле шелковичной моли [29], у цыплят [12, 27] и в тканевых культурах [17].

В наших исследованиях [1, 8] также была выявлена корреляция между активностью аргиназы и ферментативным биосинтезом пролина из орнитина в течение онтогенетического развития тутового шелкопряда.

Неуреотелическая аргиназа по ряду физико-химических свойств ( $K_m$ ,  $K_i$ , мол. вес) отличается от уреотелической. Так, для аргиназы

дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*  $K_m$ —12,5 мМ [15], для аргиназы *Neurospora crassa* — 100—200 мМ [15, 24, 25], а для печени крыс — 20—40 мМ [25].

Особенно эффективными ингибиторами для аргиназы являются орнитин и лизин [20].

Интересными являются работы по ингибированию аргиназы пролином, поскольку аргинин и пролин по структуре различны. Тем не менее данные свидетельствуют о том, что пролин ингибирует очищенную аргиназу печени и почек крыс [20], а также аргиназу печени овцы мышшей [22], причем авторы предполагают, что наблюдаемое ингибирование носит конкурентный характер и что пролин связывается с активным центром фермента.

В данной статье приводятся сведения о некоторых свойствах аргиназы инфузорий *P. multimicronucleatum*, в частности  $K_m$  и ингибирующие влияния ( $K_i$ ) различных аминокислот на активность фермента.

*Материал и методика.* Объектом исследования служили свободно живущие инфузории *P. multimicronucleatum*. Инфузории выращивались на салатной среде по Сенебери [2]. Гомогенизировались в 0,1 М калий фосфатном буфере (рН 7,2) в стеклянном гомогенизаторе.

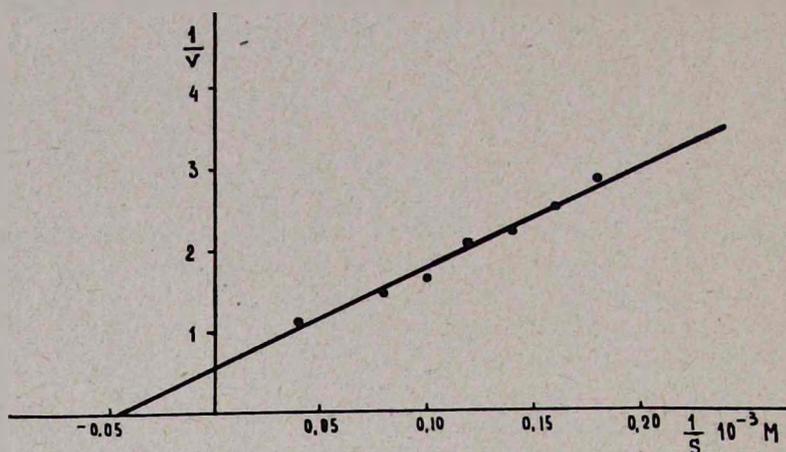
Аргиназная активность в препаратах определялась путем инкубирования их при 37°C в течение 60 мин (0,2 М глициновый буфер, рН 9,5) в присутствии L-аргинина (50 мкмоль) и  $MnCl_2$  (5 мкмоль) с последующим определением образовавшейся мочевины уреазным методом [10]. Объем инкубационной смеси—3,6 мл.

Определение белка проводилось по Лоури и др. [23], константы Михаэлиса—по методу Лайнуивера и Бэржа [4], константы ингибирования—графическим методом Диксона и Уэбба [4]. При этом влияние различных концентраций ингибиторов (лизин, орнитин, ГАМК, пролин—от 20 до 80 мкмоль) изучалось при двух концентрациях L-аргинина 30 и 60 мкмоль.

*Результаты и обсуждение.* Константа Михаэлиса для L-аргинина изображена на рис. 1.  $K_m$  для L-аргинина у изучаемых инфузорий составляет  $21,1 \times 10^{-3}$  М. По Чейну и Козину [15], для аргинина у *Sacch. cerevisiae*  $K_m$  в глициновом буфере составляет 12,5 мМ, а в фосфатном буфере—250 мМ, для *N. crassa* [25]—100—200 мМ, а по тем же авторам, для фермента печени крыс 20—40 мМ. Для аргиназы мозга быка [18] и мозга крыс [6] соответственно установлены величины 9 мМ и 16 мМ. Таким образом, найденное нами значение  $K_m$  почти в два раза меньше, чем для фермента *Sacch. cerevisiae* и в 8—10 раз больше, чем для фермента *N. crassa*.

Изучалось и ингибирование аргиназы инфузорий различными аминокислотами. Приведенные в табл. 1 данные показывают, что аргиназа инфузорий *P. multimicronucleatum* значительно ингибируется не только L-орнитинном, но и пролином и ГАМК. Лизин неожиданно оказывает слабый эффект. Отсутствие ингибирования при аспартате свидетельствует о специфическом влиянии перечисленных аминокислот на аргиназу.

Нас интересовал характер ингибирования аргиназы указанными аминокислотами. Поэтому мы изучали кинетику этого процесса, исполь-



Кривая Лайнуивера-Бэрка для аргиназы инфузорий

Рис. 1. Кривая Лайнуивера-Бэрка для аргиназы инфузорий.

Таблица 1  
Ингибирование аргиназы инфузорий *P. mult-*  
*micropusleatum* различными аминокислотами

Ингибаторы	Активность, мкмоль (час) мг белка	% ингиби- рования
Контроль	0,46	0
l-орнитин	0,22	52
ГАМК	0,26	44
l-лизин	0,38	18
l-пролин	0,23	50
l-аспаргат	0,45	0

зую кривые Лайнуивера и Бэрка. Из рис. 2 видно, что l-орнитин, ГАМК и l-лизин являются конкурентными ингибиторами, а пролин — неконкурентным (рис. 3).

О конкурентном характере ингибирования аргиназы l-орнитином, l-лизином и ГАМК имеются многочисленные данные [9, 14, 20, 26].

В ряде случаев указывается, что эти аминокислоты у определенных объектов оказывают и неконкурентное ингибирующее влияние на аргиназу [13, 26].

Нами вычислены также константы ингибирования ( $K_i$ ) аргиназы у инфузорий графическим методом в случае с l-орнитином, ГАМК, l-лизином и l-пролином. Полученные данные (рис. 4, 5, 6, 7) показывают, что для l-орнитина  $K_i$  составляет  $5,056 \cdot 10^{-3}$  М, для ГАМК —  $4,7 \cdot 10^{-3}$  М, для l-лизина —  $12,5 \cdot 10^{-3}$  М, для пролина —  $8,61 \cdot 10^{-3}$  М. Причем в последнем случае кривая подтверждает неконкурентный характер ингибирования. По данным других исследователей,  $K_i$  аргиназ различных объектов в отношении l-орнитина колеблется в пределах  $1,34 \cdot 10^{-3}$  —  $3,6 \cdot 10^{-3}$  М, [3, 13], l-лизина —  $2,37 \cdot 10^{-3}$  —  $6,3 \cdot 10^{-3}$  М.

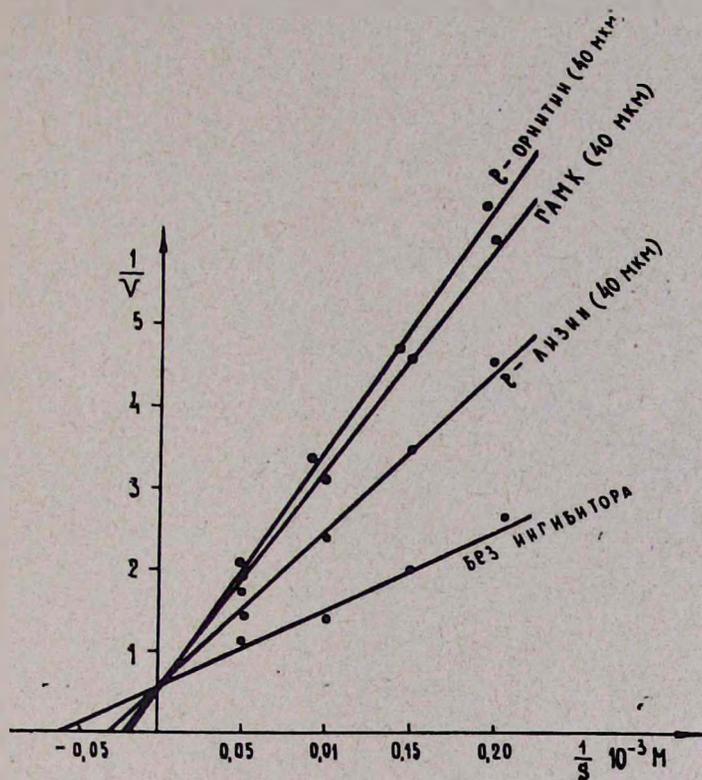


Рис. 2. Конкурентное ингибирование аргиназы инфузорий орнитином, лизином и ГАМК.

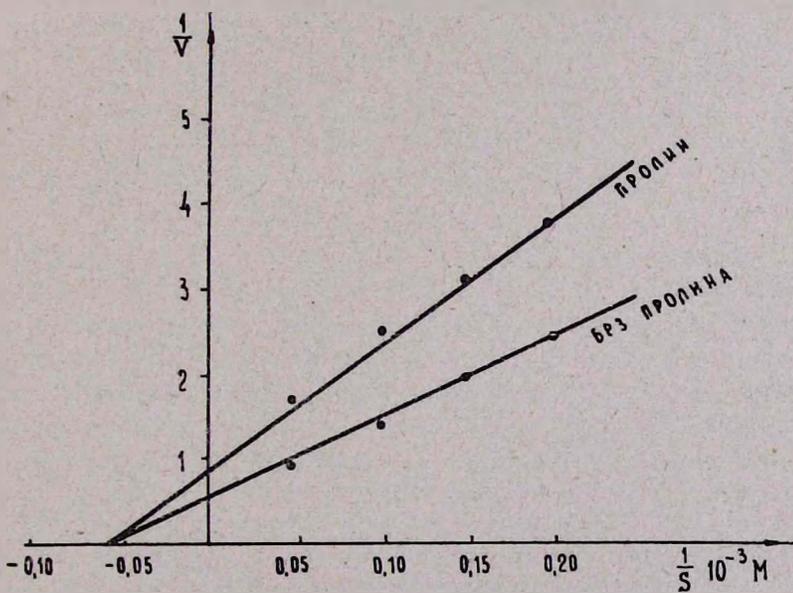


Рис. 3. Неконкурентное ингибирование аргиназы инфузорий пролином.

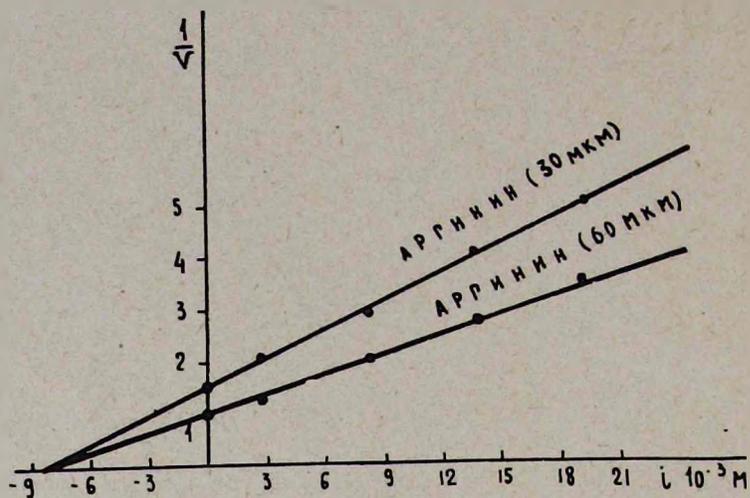


Рис. 4. Ингибирующее влияние (Ki) l-орнитина на аргиназу инфузорий.

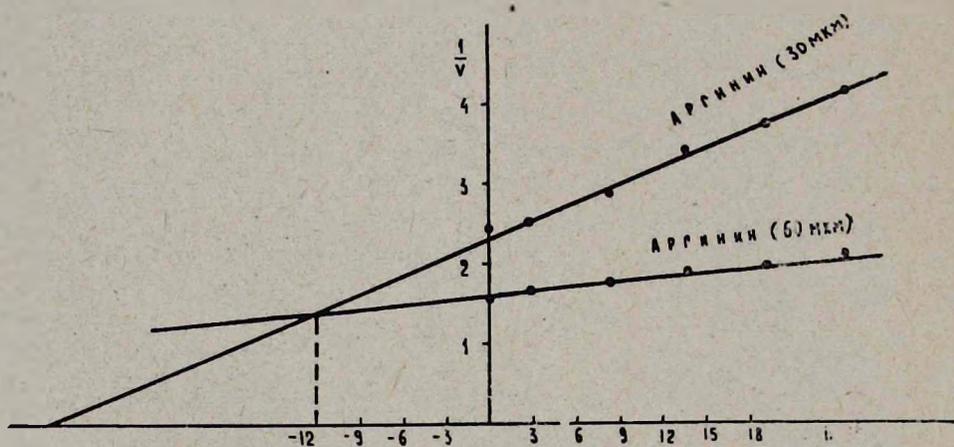


Рис. 5. Ингибирующее влияние (Ki) l-лизина на аргиназу инфузорий.

[3, 14],  $\text{ГАМК} - 11 \cdot 10^{-3} \text{ M}$  [9], что согласуется с нашими данными. Определенный интерес представляет обнаруженное нами ингибирование аргиназы инфузорий пролином неконкурентным механизмом. Возможно, на ферменте имеется аллостерический центр для пролина. Для окончательного решения вопроса, безусловно, необходимы дальнейшие исследования, но обнаруженный нами факт ингибирования аргиназы пролином является доказательством существования связи между аргиназой и механизмом биосинтеза пролина. Возможно, пролин по принципу обратной связи регулирует активность первого фермента (аргиназы) системы биосинтеза пролина. Следует отметить, что ингибирующее влияние пролина на аргиназу некоторых объектов [19—22] было выявлено и другими исследователями. Однако характер этого

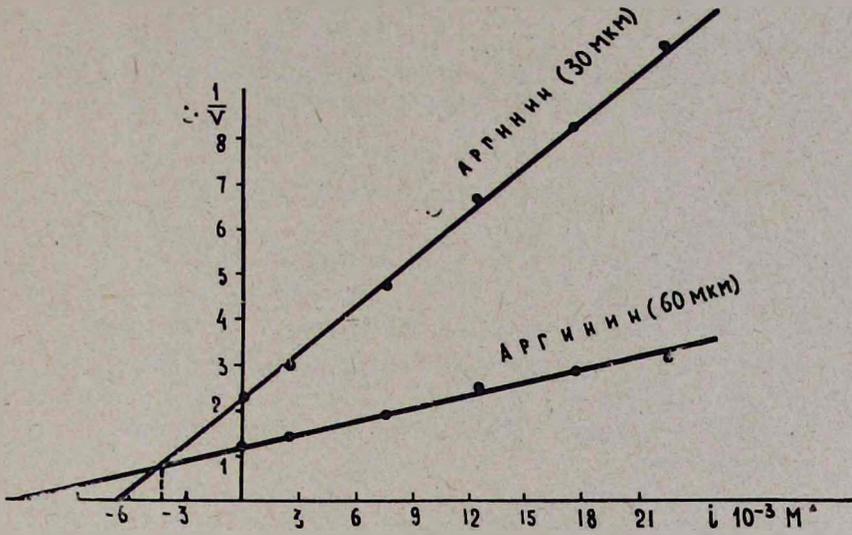


Рис. 6. Ингибирующее влияние (Ki) ГАМК на аргиназу инфузорий.

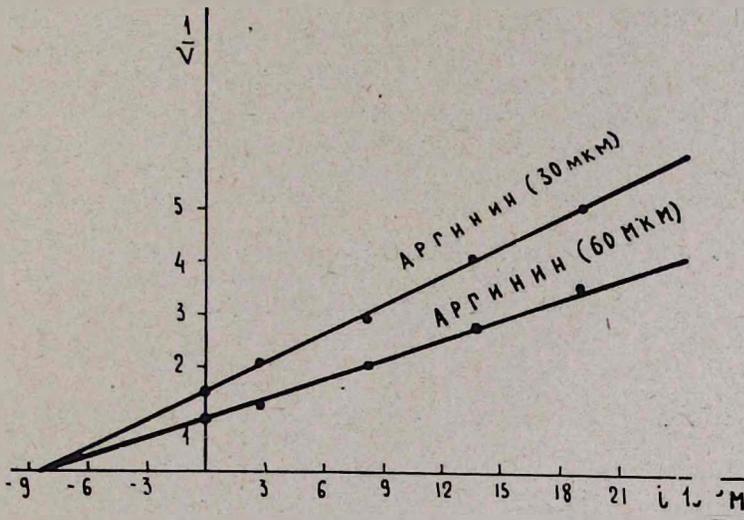


Рис. 7. Ингибирующее влияние (Ki) l-пролина на аргиназу инфузорий.

ингибирования изучался лишь в случае опухоли молочной железы [22]. Показано, что он носит конкурентный характер и, следовательно, эффектор (пролин) связывается с каталитическим участком фермента.

Таким образом, результаты данной работы являются дополнительным доказательством функционирования аргиназы в направлении биосинтеза пролина у инфузорий *Paramecium multimicronucleatum*.

Ереванский государственный университет,  
кафедра биохимии

Поступило 19.I 1976 г.

Ք. ՅԱ. ԶԱՐՈՒՅՑԱՆ, Ա. Խ. ԱՂԱԶԱՆՑԱՆ, Մ. Ա. ԴԱՎԹՅԱՆ

ԻՆՖՈՒՉՈՐԻԱՆՆԵՐԻ PARAMECIUM MULTIMICRONUCLEATUM  
ՏԵՍԱԿՆՆԵՐԻ ԱՆԲՋԻՋ ՄՁՎԱԾՔԻ ԱՐԳԻՆԱԶԱՅԻՆ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ  
ԸՆԿՃՈՒՄԸ ՄԻ ՔԱՆԻ ԱՄԻՆԱԹՔՈՒՆՆԵՐՈՎ

Ա մ փ ո փ ու մ

Ուսումնասիրվել է մի քանի ամինաթթուների ընկճող ազդեցությունը ինֆուզորիաների անբջիջ մզվածքի արգինազային ակտիվության վրա: Սահմանվել է Միխաելիսի (Km) և ինհիբիցիայի (Ki) հաստատումները: Մեր կողմից ապացուցվել է, որ Km 1-արգինինի համար ուսումնասիրված ինֆուզորիաների արգինազայի նկատմամբ կազմում է  $21 \times 1 \times 10^{-3}$  Մ:

Հաստատվել է նաև, որ արգինազային ակտիվության վրա խիստ ընկճող ազդեցություն են ունենում 1-օրնիտինը և 1-պրոլինը: Ընդորում 1-օրնիտինը, ԳԱԿԹ և 1-լիզինը համարվում են մրցակցային ինհիբիտորներ, իսկ 1-պրոլինը՝ ոչմրցակցային:

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Агаджанян А. Х., Давтян М. А. Биологический журнал Армении, 27, 5, 19, 1974.
2. Агаджанян А. Х., Заробян Т. Я., Давтян М. А. Биологический журнал Армении, 28, 5, 30, 1975.
3. Геворкян Д. М., Кочарян М. Т., Биологический журнал Армении, 25, 11, 29, 1972.
4. Давтян М. А., Бунятыян Г. Х., Геворкян Д. М., Баблоян Р. С., Петросян Л. А. Тез. Всесоюзн. биохим. съезда секции. 7, 4, Ташкент, 1964.
5. Давтян М. А. Вопросы биохимии мозга, 4, 237, Ереван, 1968.
6. Давтян М. А., Бунятыян Г. Х. Биохимия, 35, 2, 412, 1970.
7. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. М., 1966.
8. Карапетян С. А., Арутюнян Т. Г., Давтян М. А. Биологический журнал Армении, 26, 12, 1973.
9. Саруханян Ж. Г., Давтян М. А. Биологический журнал Армении, 26, 3, 1973.
10. Силакова А. И., Труц Г. Н., Являкова А. Вопросы мед. химии, 8, 588, 1962.
11. A-chilbald R. M. J. Biol. Chem., 1956, 121, 1944.
12. Austle R. E. J. Nutr. 103, 999, 1973.
13. Baret R., Mourgue M., Broc A. Comp. Rend. Soc. Biol., 58, 10, 1914, 1964.
14. Cambell J. W. Comp. Biochem. Physiol., 18, 179, 1966.
15. Gastrowska A., Poremska L., Mochanacha J. Acta biochim. Polonica, 16, 175, 1969.
16. Chan P. Y., Cossins E. A. Plant; cell. Physiol., 14, 641, 1973.
17. Davtlan M. A., Bunatlian H. Ch., J. Neurochemistry, 13, 743, 1967.
18. Eagle H., Washington C. L., Levy M. J. Biol. Chem., 240, 3944, 1965.
19. Hunter A., Downs C. E. J. Biol., Chem., 1957, 427, 1945.
20. Kaysen G. A., Strecker H. J. Biochem. J., 133, 779, 1973.
21. Kesava Rao R. V., Reddy S. R. R., Swami K. S. Int. J. Biochem., 4, 62, 1973.
22. Kesava Rao R. V., Pal S. R., Vapat C. V. Br. J. Cancer 30, 129, 1974.
23. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem., 193, 265, 1951.
24. Mora J., Salceda R., Sancher S. J. Bacterol., 110, 870, 1972.
25. Mora J., Tarrab R., Bujallil L. F. Biochim. Biophys. Acta, 118, 206, 1966.
26. Mora J., Martuscelll J., Oztiz-Pineda J., Sobron G. Biochem. J., 96, 28, 1965.
27. Nelshel.n M. C., Garlich J. D. J. Nutr., 79, 311, 1963.
28. Ratner S., Morell H., Carvalho E. Arch. Biochem. Biophys., 91, 28, 1960.
29. Reddy S. R. R., Campbell J. W. Biochem. J., 115, 495, 1969.
30. Watts D. C., Watts R. L. Comp. Biochem. Physiol., 17, 785, 1966.
31. Yip M. C. M., Knox W. E. Biochem. J., 127, 893, 1972.