

## КАТАБОЛИЗМ ПРОЛИНА У ЖУКОВ ФАСОЛЕВОЙ ЗЕРНОВКИ *ACANTHOSCELIDES OBTECTUS* SAY.

Дж. Г. ГУКАСЯН, А. А. АГДЖАНЯН

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

Ферменты катаболизма пролина жуков фасолевой зерновки локализованы в митохондриях. Их активность увеличивается в процессе развития жуков более чем в 60 раз. Все испытанные аминокислоты (за исключением глицина), особенно аргинин, стимулируют процесс окисления пролина, а пируват, лактат,  $\alpha$ -глицерофосфат, ПХМБ и гидроксилламин, наоборот, ингибируют его превращение в глутамат через пирролин-5-карбоновую кислоту, идентифицированную методом бумажной хроматографии.

Հորի ընդակերի բզեզներում պրոլինի կատարողիզմի ֆերմենտները տեղակայված են միտոքոնդրիումներում, որոնց ակտիվությունը բզեզների զարգացման ընթացքում ավելանում է շուրջ 60 անգամ: Փորձարկված բոլոր ամինաթթուները (բացառությամբ գլիցինի) և առանձնապես արգինինը խթանում են պրոլինի օքսիդացման պրոցեսը, իսկ պիրուվատը, լակտատը,  $\alpha$ -գլիցերոֆոսֆատը, ՊՅՄԲ և հիդրոքսիլամինը, ընդհակառակը, ընկճում են այդ պրոցեսը: Պրոլինի փոխարկումը գլուտամատի կատարվում է պիրոլին-5-կարբոքսիլատի միջոցով, որը է բնորոշվել է իզոլային քրոմատոգրաֆիայի մեթոդով:

Enzymes of proline catabolism of haricot beetles are localized in mitochondria. Their activity increases in the process of beetles development for more than 60 times. All the examined amino acids (with the exception of glycine), especially arginine, stimulate the process of proline oxidation, whereas pyruvate, lactate,  $\alpha$ -glycerophosphate, PKhMB and hydroxylamine, on the contrary, inhibit its transformation into glutamate through pyrroline-5-carboxylic acid, which is identified by paper chromatography.

Зерновка фасолевая — пролин — пролиноксидаза — пирролин-5-карбоксилатдегидрогеназа — аргинин.

Пролин включается в метаболический путь через глутамат [1]. Его окисление у животных происходит ПО и П5КД. Процесс нуждается в кислороде, а акцептором электронов служит цитохром с. Кофактором вюрора фермента является НАД<sup>+</sup>.

У растений и некоторых микроорганизмов нередко [11, 12] первым ферментом распада пролина является пролиндегидрогеназа, коферментом которой является НАД<sup>+</sup>. С окисленной НАДФ реакция не протекает.

В летательных мышцах *Pisortia regina* при полете пролин окисляется в 130 раз интенсивнее, чем остальные аминокислоты. В летательные мышцы этих насекомых проникает пролин,  $\alpha$ -глицерофосфат и пируват, но не глутамат и другие субстраты цикла Кребса [13]. В начале полета увеличивается концентрация пирувата, который затем интен-

Сокращения: ПО — пролиноксидаза, П5КД — пирролин-5-карбоксилатдегидрогеназа, ОПРО — оксипролин.

сивно превращается в аланин. Причем увеличение последнего находится в отрицательной коррелятивной зависимости с содержанием пролина [14]. Установлено также, что при полете колорадского жука количество аланина в его митохондриях, образовавшегося в результате окисления пролина, равно количеству использованного пролина [15].

ПО и П5КД являются митохондриальными ферментами как у животных [5], так и у микроорганизмов [4]. Попытки перевести их в растворимую фракцию у *E. coli* [4] не увенчались успехом. В летательных мышцах *Phormia regina* для ПО строгим ингибитором является лактат и несколько более слабым — пируват [13].

У *Salmonella typhimurium* [3] ПО и П5КД индуцируются пролином и подвергаются катаболической репрессии; предполагается, что гены, контролируемые ПО и П5КД, находятся в одном опероне. У *Clostridium sporogenes* [10] катаболизм пролина, как и у растений, осуществляется пролиндегидрогеназой, активность которой не ингибируется L-глутаматом. Гидроксилламин (0,5 мМ) не оказывает влияния на активность этого фермента, в то время как активность редуктазы ингибируется полностью.

Настоящая работа посвящена изучению ферментов распада пролина и некоторым их регуляторным свойствам у жуков фасоловой зерновки.

**Материал и методики.** Объектом исследования служили жуки *A. oblectus*, откладывающие яйца на бобах фасоли. Самка начинает откладывать яйца через 2—3 ч после выхода из куколки в течение 10—12 дней. Активность ПО и П5КД определяли в гомогенатах и ее нерастворимой фракции. Жуков гомогенизировали в 0,1 М калий фосфатном буфере (рН 8,0). Гомогенаты центрифугировали при 18000 об/мин 20 мин. Надосадок удаляли, осадок растворяли в 4 мл 0,01 М трис-НСl буфере, содержащем ЕДТА (рН 8,2), и центрифугировали при 15.000 об/мин в течение 30 мин. Эту процедуру повторяли 3 раза. В последний раз к осадку добавляли 10%-ный этиловый спирт, замораживали, оттаивали и центрифугировали при 15.000 об/мин 30 мин. Растворенный в 0,01 М трис-НСl буфере (с ЕДТА, рН 8,2) осадок применяли как ферментный препарат.

**Определение активности ПО и П5КД.** Инкубационная среда в 1,9 мл содержала: 53 мМ калий фосфатного буфера (рН 8,0), 0,2 мМ L-пролина, 1,6 мМ цитохрома с, 0,1 мМ НАД+. Инкубацию проводили при 37° в течение 60 мин. Реакцию останавливали добавлением 96%-ного холодного этилового спирта в соотношении 1:1. Осадок удаляли центрифугированием при 10.000 об/мин в течение 10 мин. Об активности ПО и П5КД судили по синтезированному глутамату, количественное содержание которого определяли методом бумажной хроматографии — проявлением 0,2%-ного раствора нингидрина в этиловом спирте. Пятно элюировали 5 мл 0,05%-ного CaCl<sub>2</sub> в 40%-ном этиловом спирте. Плотность окраски определяли путем фотометрирования на фотоколориметре типа КФК-2 с зеленым фильтром.

**Результаты и их обсуждение.** Изучение активности ПО и П5КД показало, что по мере развития жуков активность ферментов окисления пролина повышается и на 12-й день почти в 40 раз превышает таковую у вылупившихся жуков. По-видимому, в последние дни развития у них повышаются энергетические потребности, что компенсируется распадом пролина и включением метаболитов в цикл Кребса. Субстратом для ПО и П5КД может служить также Опро, хотя их активность в этом

случае незначительна. Интересно, что указанные ферменты абсолютно не проявляют активности, когда субстратом служит DL-пролин. Очевидно, D-форма не только не является субстратом для этих ферментов, но и наличие ее в инкубационной среде подавляет ПО активность в отношении природного субстрата.

Таблица 1. Динамика активности ПО и П5КД в разные дни развития жуков фасольной зерновки

Субстраты, М	Дни развития жуков	Активность, мкМ/глу на 1 г ткани (n=5)
L-про 2·10 <sup>-4</sup> М	1	1.44±0.17
	3	15.76±0.47
	5	19.62±0.65
	8	46.60±1.25
	12	63.71±1.32
Опро 2·10 <sup>-4</sup>	12	1.85±0.28
DL-про 2·10 <sup>-4</sup>	12	0
DL-про 4·10 <sup>-4</sup>	12	0

Таблица 2. Влияние L-аргинина на активность ферментов окисления пролина в осадке гомогената жуков фасольной зерновки (2-й день развития)

Концентрация аргинина 10 <sup>-6</sup> М	Активность ПО и П5КД, мкМ/глу на 1 г ткани (n=6)
Контроль	12.38±0.42
5	102.42±2.39
10	69.74±1.35
20	28.21±0.96
30	12.82±0.76
50	10.50±0.78
100	0
200	0

Изучено распределение ферментов окисления пролина в растворимой и в нерастворимой фракциях гомогената после центрифугирования в течение 20 мин. при 18000 об/мин. Указанная активность в целом гомогенате жуков составляет 64.42±1.73, в осадке—63.38±1.41 мкМ, в то время, как в надосадке она полностью отсутствует. Таким образом, как и у других организмов [6] ферменты окисления пролина у жуков локализованы исключительно в осадочной фракции, очевидно, в митохондриях. В дальнейших экспериментах использовали осадок гомогената, полученный способом, описанным в методической части. Установлена оптимальная концентрация субстрата для проявления максимальной активности ПО и П5КД. Она составляет 200 мкМ.

Из литературы известно индуцирование ПО аргинином у *Vac. licheniformis* [8]. Разумеется, у эукариотов отсутствует возможность субстратной индукции. Однако мы задались целью выяснить влияние аргинина на активность ПО у жуков (табл. 2).

Данные таблицы показывают, что при низких концентрациях аргинина значительно стимулирует процесс окисления пролина. Максимальное стимулирование достигается при концентрации 10<sup>-6</sup> М. При дальнейшем увеличении концентрации аргинина активность снижается и при концентрации 10<sup>-4</sup> М полностью подавляется. Очевидно, аргинин является модулятором ПО, причем положительным—при низких концентрациях и отрицательным—при высоких.

В табл. 3, 4, 5 приведены результаты изучения влияния НАД<sup>+</sup>, цитохрома с, некоторых аминокислот, кетокислот и ряда ингибиторов на процесс окисления пролина.

Данные приведенных таблиц показывают, что при окислении пролина глутамат в значительном количестве образуется и без добавления в реакционную среду цитохрома с. Это объясняется тем, что в це-

Таблица 3. Влияние НАД<sup>+</sup> и цитохрома с на окисление пролина у жуков фасольевой зерновки (12-й день развития)

Кофакторы (по $5.25 \cdot 10^{-3}$ М)	Активность ПО и ПБКД, мкМ глау на 1 г ткани (n=5)
Полная система:	76.37±1.27
Система (с НАД <sup>+</sup> и цитохрома с)	7.15±0.59
Система (без цитохрома с)	39.75±0.81
НАД <sup>+</sup> заменен НАДФ <sup>+</sup>	4.72±0.11
НАД <sup>+</sup> заменен НАДФ <sup>H</sup>	5.79±0.18
НАД <sup>+</sup> заменен НАДН	3.12±0.10

Таблица 4. Влияние аминокислот и некоторых других соединений на окисление пролина у жуков фасольевой зерновки (5-й день развития)

Аминокислоты (по $2.1 \cdot 10^{-3}$ М)	Активность ПО и ПБКД, мкМ глау на 1 г ткани (n=5)	Аминокислоты (по $2.1 \cdot 10^{-3}$ М)	Активность ПО и ПБКД, мкМ глау на 1 г ткани (n=5)
Без эффлектора	19.40±0.86	Гли	11.41±0.54
Лей	26.37±1.15	Цис	33.59±1.06
Ала	29.29±1.05	Гутатин	21.51±1.12
Вал	22.35±0.99		

Таблица 5. Влияние ингибиторов на окисление пролина у жуков фасольевой зерновки (5-й день развития)

Ингибиторы	Активность ПО и ПБКД, мкМ глау на 1 г ткани (n=5)
Без эффлектора	19.11±1.05
Нируват, $2 \cdot 10^{-3}$ М	0.84±0.04
Ликоп, $2 \cdot 10^{-3}$ М	1.81±0.05
α-глицерофосфат $2 \cdot 10^{-3}$ М	5.14±0.10
ПхМБ, $3.3 \cdot 10^{-3}$ М	19.37±1.05
ПхМБ, $3.3 \cdot 10^{-4}$ М	3.18±0.10
ПхМБ, $3.3 \cdot 10^{-5}$ М	0
Гидроксиламин $10^{-3}$ М	1.27±0.07

ных гомогенатах содержится достаточное количество цитохрома с для нормального протекания процесса окисления пролина [2]. Полученные данные свидетельствуют также о том, что кофактором для ПБКД является окисленный НАД. Процесс окисления пролина фактически не протекает в присутствии окисленного НАДФ. Из испытанных аминокислот на окисление пролина ингибирующее влияние оказывает глицин, остальные аминокислоты в разной степени стимулируют этот процесс.

Согласно данным литературы [9], L-формы серина, лейцина, глицина, валина и аланина в отдельности (при концентрации 40 мкМ в 3 мл) подавляют активность П5КД митохондрии коркового слоя почек быка на 11,4; 24,2; 31,6; 60,3 и 70,9% соответственно. Смесь этих аминокислот оказывает кумулятивное ингибирующее действие на активность П5КД, степень которого достигает 91,5%. Таким образом, изученный нами фермент в отношении влияния на него аминокислот значительно отличается от соответствующего фермента почек быка. Так, если для фермента жуков испытанные аминокислоты (кроме глицина) являются положительными эффекторами, то для фермента почек быка — отрицательными.

Данные показывают также, что окисление пролина в высокой степени подавляется пируватом, лактатом и  $\alpha$ -глицерофосфатом. В этом отношении процесс ферментативного окисления пролина у жуков близок к таковому у других организмов [6]. Данные табл. 5 показывают, что ПХМБ в концентрации  $10^{-6}$  М и выше способен подавлять активность ферментов окисления пролина. По-видимому, ПХМБ оказывает ингибирующее влияние на активность П5КД, которая, как известно из литературы [6], является тиоловым ферментом. Гидроксиламины также подавляют активность ферментов окисления пролина при более высоких концентрациях ( $10^{-3}$  М).

Для изучения механизма окисления пролина, а именно возможности его предварительного превращения в пирролин-5-карбоксилат, первоначально создавали полную систему окисления пролина в глутамат, а затем исключали из среды НАД<sup>+</sup>, предотвращая переход пирролин-5-карбоксилата в глутамат. Накопившийся при этом пирролин-5-карбоксилат определяли хроматографически (табл. 6).

Таблица 6. Образование глутамата и пирролин-5-карбоксилата из пролина у жуков фасолевой зерночки (12-й день развития)  $n=5$

Варианты	Образование глутамата из прол., мкМ на 1 г ткани	Образование пирролин-5-карбоксилата из прол., мкМ на 1 г ткани
Полная система	66.74±1.85	0.60±0.07
Система без НАД <sup>+</sup>	5.53±0.28	2.55±0.25
Система без НАД <sup>+</sup> и диоксирама с	4.69±0.24	4.74±0.41

Полученные данные показывают, что при отсутствии восстановленного НАД образовавшийся из пролина пирролин-5-карбоксилат не восстанавливается в глутамат. Образование глутамата в системе без НАД<sup>+</sup> объясняется наличием эндогенного кофактора в гомогенате. Таким образом, включение пролина в метаболический путь осуществляется через промежуточный продукт пирролин-5-карбоксилат.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Гильмур Н. Метаболизм насекомых, М., 1968.

2. Brusemer R. W., Veerabhadrappa P. S. Biochem. Biophys. Acta, 110, 102, 1965.
3. Dendinger S., Brill W. J. J. Bacteriol., 103, 144—152, 1970.
4. Frank L., Ranhand B. Arch. Biochem. Biophys., 107, 325—333, 1964.
5. Hertfeld A., Mezl V. A., Knox W. E. Biochem. J, 166, 95—102, 1977.
6. Jonson A B., Strecker H J. Biol. Chem., 237, 1876—1882, 1962.
7. Kovatoff E. M., Phang J. M., Granger A. S., Downings. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 71, 5368—71, 1977.
8. Laishley E. J., Berthel R. A. J. Bacteriol., 96, 322, 1968.
9. Lundgren D., Ogur M. Biochem. Biophys. Res. Commun. 49, 147—149, 1972.
10. Monticello D. J., Costiloz R. V. Can. J. Microbiol., 27, 942—948, 1981.
11. Namer A. D., Stewart C. Plant Physiol., 53, 440—444, 1974.
12. Rena A. B., Splittstoesser W. F. Phytochemistry, 13, 2081—2084, 1974.
13. Sacter B., Chidress C. C. Arch. Biochem. Biophys., 124, 583—588, 1967.
14. Sacter B., Whermser—Sawell E. J. Biol. Chem., 241, 624, 1966.
15. Woods E., Kort C. A. D., Beenackers A. M. Insect Biochem., 10, 305—311, 1980.

Поступило 5.VIII 1987 г.

Биолог. ж. Армения, т. 41, № 4, 1988

УДК 577.3991.64

## ВЛИЯНИЕ ЦИТЕАМИНА И ГЛИЦЕРИНА НА КЛЕТКИ *E. coli* ПРИ ДЕЙСТВИИ ИЗЛУЧЕНИЯ С РАЗНОЙ ЛИНЕЙНОЙ ПЕРЕДАЧЕЙ ЭНЕРГИИ

И. В. СИМОНЯН, И. Л. ДЖАННОЛЯДЯН, Л. Г. СТЕПАНЯН

Ереванский физический институт ГКАЭ

На клетках *E. coli* К-12 разных генотипов показано, что защитное действие цистеамина и глицерина при действии  $\gamma$ -излучения и рентгеновых лучей генетически детерминировано: при использовании цистеамина это выражается в отсутствии радиозащитного эффекта у репарационных мутантов, а в случае применения глицерина—в возрастании протекторного влияния в ряду излученных штаммов *E. coli*: *rec A*-мутант—клетки «дикого типа»—роль *A*-мутант. Глицерин защищает клетки дикого типа и *rec A*-мутанта и от летального действия ускоренных ионов ультрафиолета и от летального действия ускоренных ионов ультрафиолета, в то время как цистеамин при действии на клетки тяжелых ионов оказывается неэффективным.

Տարբեր զենոսիպերի *E. coli* К-12 բջիջների վրա զոլյա է տրված, որ դի-զերիերի և ռենտգենիանի պաշտպանողական ազդեցությունը  $\gamma$ -առտազայների և սննդղեղեյան ճառագայթման զեպրում զենեարիերեն զեակրմիտոզիան է: Ֆրակտ-միերի օգտագործման զեպրում զա տրտաեյուպում է մոտաեոնների համար պաշտ-պանողական էֆեկտի բուտակայությունը: Ինչ զիջերիեր օգտագործման զեպրում՝ ճեակոզոպիոզ շտամների պաշտպանողական նաակոբյան անոյ ճեակոզոյ ճաշար-զականությունը: *rec A*-մոտաեոն—օվայրիե տիպի բջիջներ—*rec A*-մոտաեոնե-րիջերիեր պաշտպանում է օվայրիե տիպի բջիջներ և *rec A*-մոտաեոնի բջիջեր պաշտպանում ինների շեակոյ (մաեոցոս) ազդեցությունը: Ֆրակտմիերի օգտա-գործումը բջիջ վրա ճեակոյ ինների ազդեցության զեպրում էֆեկտիվ չէ:

Сокращения: ОР—однонитевые разрывы, ДР—двунилевые разрывы, ЭДР—энди-матические двунилевые разрывы, ПДР—прямые двунилевые разрывы, Л—линейная передача энергии, ФУД—фактор уменьшения дозы.