

**ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ЭФФЕКТОРОВ НА ФЕРМЕНТЫ
БИОСИНТЕЗА ПРОЛИНА В КОРЕШКАХ И СТЕБЛЯХ ГОРОХА
*PISUM SATIVUM L.***

А.Х. АГАДЖАНЯН, М.Б. МОЛАИ РАД, М.А. ДАВТЯН

Ереванский государственный университет, кафедра биохимии, 375049

Установлена обратная корреляция между содержанием свободного пролина и интенсивностью прорастания семян гороха на свету, подобная корреляция не обнаружена в темноте.

Активность ферментов биосинтеза пролина повышается при замачивании семян гороха в среде, содержащей окисленный НАД.

Биосинтез пролина усиливается при выращивании семян гороха в среде с хлористым натрием, причем трансаминирование орнитина довольно интенсивно протекает с а-кетоглутаратом, несколько слабее с ЩУК, а с пируватом оно вовсе не имеет места.

Установлено стимулирование активности ферментов биосинтеза пролина на свету в присутствии фруктозы и фруктозы с АТФ.

Наличие сахарозы в среде роста приводит к накоплению свободного пролина и набора РНК, с одной стороны, и слабому прорастанию с низкой общей массой семян - с другой.

Լույսի ազդեցության տակ հաստատվել է ազատ պրոլինի և ոլոռի սերմերի աճման ինտենսիվության միջև հակադարձ կապ: Նման կապ չի հայտնաբերվել մթության պայմաններում:

Պրոլինի կենսասինթեզի ֆերմենտների ակտիվությունը ուժեղանում է ոլոռի սերմերը նախօրոք օքսիդացված ՆԱԴ պարունակող միջավայրում մշակելիս:

Պրոլինի կենսասինթեզը ուժեղանում է ոլոռի սերմերը NaCl-ի միջավայրում աճեցնելիս, որտեղ օրնիտինի տրանսամինացումը կատարվում է a-կետոգլուտերատի հետ, և քիչ թույլ օքսալոացետատի հետ և թուրոլին տեղի չի ունենում պիբավատի հետ: Հաստատվել է պրոլինի կենսասինթեզի ֆերմենտների ակտիվության խթանում լույսի պայմաններում ֆրուկտոզի և ֆրուկտոզ + Աեֆ-ի առկայությամբ:

Աճեցման միջավայրում սախարոզի առկայությունը հանգեցնում է մի կողմից պրոլինի և ՌՆԹ-ի կուտակմանը, մյուս կողմից սերմերի վատ աճմանը:

Invert correlation between the content of free proline and indesity growth of the pea soods in the light already is established, while same correlation in the dark not indicated.

Activity of proline biosynthesis enzymes increases by adding NAD (oxidized) to wetling medium.

Adding sodium chloride (NaCl) to seeding medium also increases proline biosynthesis. There at a-ketoglutarate in transaminasiing of ornitine participates enough active and oxaloacetate less than it, but pyruvate does not participate.

Fructose and accompanied with ATP stimulates activity proline biosynthesis enzymes in the light.

Presence of sucrose in seeding medium leads to the accumulation of proline and RNA, slow germination and loss in weight of seeds.

Растения гороха - биосинтез пролина - эфффекторы синтеза

Несмотря на то, что эксперименты по изучению превращения орнитина в пролин имеют сравнительно давнюю историю, лишь в 70-е годы подтвердилось прямое участие орнитин - б - трансаминазы (ОТА) в этом

процессе. Роль ОТА в биосинтезе пролина подтвердилась при изучении культур клеток яичников китайского хомячка [10].

Биосинтез пролина из орнитина довольно подробно исследован на многочисленных объектах, от одноклеточных до млекопитающих [1, 3, 7]. Орнитин в организме образуется в основном из аргинина, расщепляемого аргиназой.

В опытах с тутовым шелкопрядом Давтяном и сотр.[2, 6] была выяснена взаимосвязь между аргиназой и ферментами биосинтеза пролина из орнитина. высказано мнение, что один из трех обнаруженных изоэнзимов аргиназы жирового тела гусениц тутового шелкопряда участвует в механизме биосинтеза пролина из орнитина и аргинина.

Местичелли и др.[9], изучая трансаминирование при биосинтезе пролина на трех видах растений, показали, что меченый пролин образуется из орнитина с меткой 3H-Y-5C. Авторы пришли к заключению, что превращение орнитина в пролин происходит не традиционным способом, а трансаминированием аминокетогруппы в α -положении с образованием α -кето- β -аминовалериановой кислоты, при циклизации которой образуется пирролин-2-карбоновая кислота (П2К). Однако для подтверждения этих данных необходимы дополнительные исследования [8].

Настоящая работа посвящена изучению влияния различных эффекторов на ферменты биосинтеза пролина в корешках и стебельках гороха.

Материал и методика. Объектом исследования служили семена гороха *Pisum sativum* L. Инкубационная смесь (3мл) для определения активности ОТА и П5КР содержала 10 мкМ L- орнитина, 20 мкМ α -кетоглутарата, 100 мкМ калий-фосфатного буфера (pH 7.6) и 0.5 мл 10 %-ного гомогената.

Инкубацию проводили при 37° в течение 1 часа. За это время орнитин среды под действием орнитин- β -трансминазы превращается в пирролин-5-карбоксилат (П5К). Затем в среду добавляли 4 мкМ НАДН и 0.5 мл свежего гомогената. Смесь инкубировали еще 15 мин. Под действием пирролин-5-карбоксилат редуктазы (П5КР) П5К превращается в пролин. Пробы центрифугировали при 8000 об/мин в течение 10 мин, после чего определяли пролин. Данные выражены в мкМ на 1 г сырой ткани.

Результаты и обсуждение. В табл. 1 и 2 приведены результаты изучения содержания свободного пролина, общей массы корней, а следовательно, и интенсивности прорастания семян гороха при выращивании на свету и в темноте.

Таблица 1. Содержание свободного пролина в корешках гороха под действием различных эффекторов при выращивании на свету

Эффекторы среды выращивания	Число проросших семян	Масса корешков, мг	Содержание свободного пролина, мкМ на 1г сырой ткани
Контроль	8	339	0.55±0.05
Фруктоза	9	395	0.50±0.05
Фруктоза+НАДФ'	9	479	0.41±0.04
Фруктоза+НАДФН	9	470	0.43±0.04
Фруктоза+АТФ	9	445	0.41±0.04

Примечание: содержание всех эффекторов в среде - 10 мг/10 мл воды; замачивание семян - 24 ч, число замоченных семян -10.

Данные табл.1 показывают, что содержание свободного пролина выше в корешках контрольных растений по сравнению с остальными вариантами. В вариантах с совместным присутствием фруктозы с нуклеотидами обнаруживается сравнительно низкое содержание пролина. Причем окисленные и восстановленные формы нуклеотидов особого влияния не оказывают на содержание свободного пролина.

Что касается интенсивности прорастания семян гороха в условиях наличия в среде исследуемых эффекторов, то следует отметить положительное влияние их, выражающееся в увеличении общей массы и числа прорастающих семян.

Таким образом, установлена обратная корреляция между содержанием свободного пролина и интенсивностью прорастания семян гороха.

В темноте (табл.2) содержание свободного пролина в контрольном варианте уступает таковому в остальных, однако отмеченная выше корреляция здесь не обнаруживается, особенно в варианте с НАДФ⁺ +фруктоза. Этот факт, очевидно, объясняется взаимосвязью между нециклическим фотосинтетическим фосфорилированием и содержанием свободного пролина.

Таблица 2. Содержание свободного пролина в корешках гороха под действием различных эффекторов при выращивании в темноте

Эффекторы среды выращивания	Число проросших семян	Масса корешков, мг	Содержание свободного пролина, мкМ на 1 г сырой ткани
Контроль	9	359	0.75±0.04
Фруктоза	9	380	0.48±0.04
Фруктоза+НАДФ ⁺	10	476	0.65±0.06
Фруктоза+НАДФН	9	471	0.45±0.04
Фруктоза+АТФ	10	490	0.47±0.04

Примечание: * Условия опыта те же.

В условиях темноты не имеет места процесс нециклического фотосинтетического фосфорилирования, поэтому не образуется ФАД - Н, из-за отсутствия активности ферредоксин: НАДФ - оксидоредуктазы, требующей 2 электрона и 2 протона. Поскольку не образуется восстановленный флавопротеид, дальнейшее восстановление НАДФ⁺ не происходит. По-видимому, в темноте окисленный НАДФ⁺ включается в пентозофосфатный цикл, который довольно интенсивно протекает при прорастании семян, и восстанавливается в НАДФН, который служит кофактором одного из ферментов биосинтеза пролина-П5КР. Это объяснение обосновано и тем, что пентозофосфатный путь расщепления глюкозы в растениях выполняет, помимо общеизвестных для животных организмов функций, также роль поставщика НАДФН, который используется как восстановитель в биосинтетических процессах, в условиях, когда не происходит образования НАДФН при отсутствии света и процесса фотосинтеза. Поэтому он имеет особенно важное значение в нефотосинтетических тканях прорастающих семян, а также в темное время суток [5].

Мы изучали также влияние среды выращивания и кетокислот на активность ферментов биосинтеза пролина в стеблях гороха. Полученные данные приведены в табл.3.

Таблица 3. Влияние среды выращивания и кетокислот на активность ферментов биосинтеза пролина в стеблях гороха (кофактор НАДН), мкМ пролина на 1 г ткани

Среда выращивания	Орнитин+а-КГ	Орнитин+пируват	Орнитин+ЩУК
Контроль	0.56 ± 0.12	0.16±0.01	0.25±0.02
Фруктоза	0,83±0,08	0	0
Фруктоза+НАДН	0	0.04±0.01	0.06±0.01
Фруктоза+НАДФ ⁺	0.22±0.02	0.20±0.03	0.33±0.04
Фруктоза+НАД ⁺	1.5±0.31	1.17±0.22	0.28±0.03
Фруктоза+НАДФН	0.39±0.04	0	0

Видно, что активность ферментов биосинтеза пролина повышается при замачивании семян гороха в среде, содержащей окисленный НАД. В этом варианте отмечена высокая активность ферментов биосинтеза пролина при трансаминировании орнитина со всеми кетокислотами. Довольно слабая активность ферментов проявляется в варианте с фруктозой и НАДН. В варианте с фруктозой трансаминирование орнитина происходит лишь с а-КГ.

Работами нашей лаборатории показано накопление свободного пролина при выращивании семян гороха в среде с хлористым натрием. Важно было выяснить, является ли накопление пролина следствием усиления его биосинтеза или оно представляет результат ингибирования активности ферментов, окисляющих пролин. Полученные данные показали, что биосинтез пролина усиливается при выращивании семян гороха в среде с хлористым натрием, причем трансаминирование орнитина довольно интенсивно протекает с а-КГ, несколько слабее с ЩУК, а с пируватом оно вовсе не происходит.

Отсутствие данных о стеблях гороха объясняется тем, что в среде с хлористым натрием наземная часть растений не прорастает.

Интересен и тот факт, что у гороха трансаминирование орнитина в корешках осуществляется только с ЩУК и не происходит с а-КГ и пируватом. Это единственный объект из изученных в нашей лаборатории (от инфузорий до млекопитающих), где отмечен подобный факт. Исследования последних лет показали, что свет активирует по меньшей мере 5 ферментов, участвующих в цикле Кальвина, а именно рибулозо-дифосфат карбоксилазу, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу, фруктозо-бис-фосфатазу, седогептулозо-бис-фосфатазу и фосфорибулозокиназу [5]. Нас интересовало, активируются ли также ферменты биосинтеза пролина под действием света?

Полученные данные показали, что в стебельках гороха стимулируется активность ферментов биосинтеза пролина в вариантах с фруктозой и фруктозой+АТФ. Это можно объяснить тем, что активация светом происходит благодаря образованию восстановленного ферредоксина, который в свою очередь активирует дифосфатазу, превращающую фруктозо-дифосфат в фруктозо-6-фосфат-стимулятор рибулозо-1.5-дифосфат карбоксилазы. При

отсутствии света дифосфатаза угривает активность, и в клетках накапливается фруктозо-дифосфат, ингибируя активность рибулозо-1.5-дифосфат карбоксилазы [4]. По-видимому, в указанных вариантах происходит фосфорилирование фруктозы с образованием ее фосфатной формы-фруктозо-6-фосфата, который стимулирует активность ферментов биосинтеза пролина, аналогично усилению активности рибулозо-1.5-дифосфокарбоксилазы.

Подтверждением вышеизложенного является то обстоятельство, что в кончиках, средней части и у основания корешков содержание пролина в темноте в 1.5 - 2 раза выше, чем на свету.

Результаты изучения влияния различных сахаров на содержание свободного пролина и набор РНК показали, что первый показатель по сравнению с таковым в вариантах с глюкозой и фруктозой почти в 2 раза выше в варианте с сахарозой в корешках и в 1.5 раза - в стебельках, а содержание РНК коррелирует со слабым прорастанием и низкой общей массой семян.

Таким образом, полученные в опытах данные подтверждают обнаруженный в нашей лаборатории на других объектах факт обратной корреляции между содержанием свободного пролина, ростом и размножением клеток.

ЛИТЕРАТУРА

1. Агаджанян А.Х., Гукасян Дж.Г. Биолог. журн. Армении, 41, 307-312, 1988.
2. Агаджанян А.Х., Давтян М.А. Биолог. журн. Армении, 27, 5, 19-23, 1974.
3. Агаджанян А.Х., Заки А.М., Давтян М.А. Биолог. журн. Армении, 43, 6, 532, 1990.
4. Бохинский Т. Воззрения в биохимии. ИЛ, М., 1986.
5. Гудвин Т., Мерсер Э. Введение в биохимию растений. М., 1986.
6. Давтян М.А., Арутюнян Т.Г., Хачатрян М.А. Биолог. журн. Армении, 29, 28-34, 1976.
7. Заробян Т.Я., Агаджанян А.Х., Давтян М.А. Биолог. журн. Армении, 29, 6, 43-46, 1976.
8. Adams E. Annu. Rev. Biochem., 49, 1005-1061, 1980.
9. Mestchelli L.J., Gupta R.W., Spenser I.D. J. Biol. Chem, 254, 640-647, 1979.
10. Valle D., Downing S.J., Phang J.M. Biochem. Biophys. Res. Commun., 54, 1418-1424, 1973.

Поступила 10.VIII.1999