

ПРОЛИНОКСИДАЗА КОРЕШКОВ И СТЕБЛЕЙ ГОРОХА *PISUM SATIVUM L.*

М.Б. МОЛАИ РАД, А.Х. АГАДЖАНИЯ

Ереванский государственный университет, кафедра биохимии, 375049

Установлено, что активность пролиноксидазы корешков стимулируется светом и полностью отсутствует в условиях темноты. Обнаружено накопление пролина при солевом стрессе, что не является результатом подавления активности фермента, а скорее представляет адаптативное свойство растения.

Цитрат в 2,5 раза стимулирует активность пролиноксидазы корешков семян гороха. В присутствии хлористого калия активность фермента удваивается.

Հաստատվել է, որ արմատների պրոլինօքսիդազի ակտիվությունը խթանվում է լույսով և լրիվ բացակայում է մթության մեջ: Հայտնաբերվել է, որ պրոլինի կուտակումը աղային ստրեսի ժամանակ արդյունք է ոչ թե պրոլինօքսիդազի ակտիվության ճնշման, այլ բույսի հարմարողական հատկության:

Ցիտրատը 2,5 անգամ խթանում է ոլոռի արմատների պրոլինօքսիդազի ակտիվությունը: КСl-ի ներկայությամբ ֆերմենտի ակտիվությունը կրկնապատկվում է:

Prolineoxidase (PO) of pea root in the light is stimulated, but in the root of germinating peas in the dark completely absents.

Salt formative stress increases quantity of free proline in the plant, that has previously shown as stress adaptational character of plants and has not determined as the result suppressed PO.

Растения гороха Pisum sativum L. - пролиноксидаза

Пролиноксидаза (ПО) (КФ 1.2.2.1) обнаружена в бактериях, растениях, тканях животных и связана с мембранами митохондрий [8]. Окисление пролина в последних протекает в присутствии кислорода с участием цитохрома С в качестве акцептора электронов. Пирролин - 5 - карбоксилат дегидрогеназа (П5КД) - второй фермент на пути окисления пролина в глутамат, катализируемый с участием лишь окисленной формы НАД.

У бактерий, дрожжей и насекомых [3,4,9] ПО индуцируется пролином высокой концентрации. По имеющимся данным [6,10], ПО и П5КД находятся под одним координационным контролем и их гены, ответственные за синтез указанных ферментов, относятся к единому оперону.

П5КД митохондрий проростков ячменя [7] характеризуется высокой чувствительностью к действию хлорида и меньшей - сульфата. Угнетение активности фермента хлористым калием достигается при повышении в реакционной смеси концентрации пирролин - 5 - карбоксилата (П5К).

В настоящем сообщении приводятся результаты изучения активности пролиноксидазы в корешках и стеблях гороха в условиях солевого стресса, а также под влиянием некоторых эффекторов.

Материал и методика. Объектом исследования служили семена гороха *Pisum sativum L.* Гомогенизацию проводили в 0.1М калий-фосфатном буфере (рН8.0).

Инкубационная среда для определения ПО и П5КД содержала: 53мМ калий-фосфатного буфера (рН 8.0), 0.2мМ L - пролина, 1.6мкМ цитохрома С и 4мкМ НАД'

Инкубацию проводили при 37° в течение 60 мин.

Реакцию останавливали добавлением 96 %-ного охлажденного этанола 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, содержание которого определяли методом бумажной хроматографии. Определение плотности окраски проводили путем фотометрирования на фотоколориметре типа КФК-2 с зеленым фильтром.

Результаты и обсуждение. Работами нашей лаборатории и других авторов установлено, что культивирование хлореллы в среде, содержащей хлористый натрий, приводит к значительному накоплению свободного пролина [1, 5]. Однако окончательно не установлена причина подобного накопления пролина: обусловлено ли оно усилением его биосинтеза или же, наоборот, является результатом снижения активности ферментов окисления пролина?

В этой связи нас интересовал механизм влияния хлористого натрия на процесс накопления свободного пролина в стебельках и корешках гороха. Полученные данные приведены в табл. I.

Таблица I. Активность пролиноксидазы в корешках и стебельках гороха в условиях солевого стресса

Органы растений	Варианты опыта	Активность фермента, мкМ глу 1г ткани
Корешки	Контроль	0,25 ± 0,05
	NaCl 50 мг	1,0 ± 0,2
	100 мг	1,25 ± 0,2
Стебельки	Контроль	0,22 ± 0,05
	NaCl 50 мг	0,15 ± 0,05
	100 мг	0

Приведенные в таблице данные свидетельствуют о том, что корешки контрольных растений, выращенные на дистиллированной воде, не обладают пролиноксидазной активностью, в то время как в присутствии хлористого натрия в них обнаруживается заметная пролиноксидазная активность. В стебельках этот показатель по сравнению с таковым в корешках почти на один порядок ниже.

Таким образом, накопление пролина при солевом стрессе не является результатом подавления ПО, скорее всего оно выражает адаптивное свойство растения. Примечательно, что пролиноксидазная активность в корешках находится в положительной корреляции с концентрацией хлористого натрия, в стебельках же активность фермента полностью подавляется при высокой концентрации этой соли.

Следующая серия экспериментов была посвящена изучению влияния некоторых эффекторов на пролиноксидазную активность в корешках гороха, выращенных на свету и в темноте.

Полученные данные приведены в табл.2, согласно которой в контрольном варианте активность пролиноксидазы в корешках, выращенных в темноте, полностью отсутствует, следовательно, она, аналогична пролинсинте тазной, стимулируется светом (неопубликованные данные нашей лаборатории).

Таблица 2. Влияние некоторых эффекторов на пролиноксидазную активность в корешках гороха, выращенных на свету и в темноте

Варианты опыта	Активность пролиноксидазы, мкМ гду на 1 г ткани	
	на свету	в темноте
Контроль	0.65±0.02	-
цитрат	30	1.5±0.1
	50	2.1±0.2
	100	3.6±0.2
АМФ	3.9±0.3	0.78±0.03
АДФ	4.2±0.3	-
АТФ	4.0±0.3	4.1±0.4
АТФ + цитрат	30	3.4±0.22
АТФ + цитрат	50	4.0±0.4
АТФ + цитрат	100	6.6±0.6

Примечание: концентрация всех кофакторов составляла 1 мкМ, содержание цитрата дано в мкМ.

Видно, что цитрат в концентрации 30мкМ примерно в 2,5 раза стимулирует пролиноксидазную активность, причем увеличение концентрации цитрата приводит к дальнейшему стимулированию фермента. Примечательно, что его активность довольно сильно (более чем в 6 раз) стимулируется адениловыми нуклеотидами - АМФ, АДФ, АТФ. Максимальное стимулирование активности пролиноксидазы наблюдается при совместном присутствии цитрата и АТФ, при концентрации цитрата 100мкМ. Следует отметить, что пролиноксидазная активность корешков гороха, выращенных в темноте, стимулируется АМФ и, особенно, АТФ. В этом отношении стимулирующий эффект АТФ почти одинаков в рассмотренных вариантах. По-видимому, это объясняется взаимосвязью обмена пролина с пепциклическим фотофосфорилированием.

Наличие АТФ в темноте полностью компенсирует световую фазу фотосинтеза, где часть световой энергии, поглощаемой хлорофиллом, превращается в химическую энергию, запасаемую в высокоэнергетических связях АТФ, и используется в темновой фазе фотосинтеза при превращении

углекислого газа в углеводы, активируя вместе с тем многие ферменты, в том числе и пролиноксидазу.

В литературе имеются данные относительно активирования пирролин-5-карбоксилат редуктазы, одного из ферментов биосинтеза пролина [2]. Нас интересовало, как регулируется активность пролиноксидазы в корешках и стебельках гороха хлористым калием в отдельности и при сочетании его с АТФ и цитратом. Полученные данные приведены в табл.3.

Таблица 3. Влияние некоторых эффекторов на пролиноксидазную активность корешков и стебельков гороха

Органы	Варианты опыта	Активность фермента, мкМ глу на 1 г ткани	Образование глу из цитрата, мкМ	Образование пролина из цитрата, мкМ
Корешки	Полная среда	0.41±0.06	-	-
	Полная среда + КСI	0.82±0.08	-	-
	Гомогенат+цитрат	-	0.41±0.05	50±2.0
	Гомогенат+цитрат+КСI	-	1.0±0.09	62±2.4
	Гомогенат+цитрат+АТФ	-	0.61±0.05	60±2.5
	Гомогенат+цитрат+АТФ+КСI	-	1.22±0.1	62±2.4
Стебельки	Полная среда	0	-	-
	Полная среда+КСI	0.34±0.03	-	-
	Гомогенат+цитрат	-	0	5.8±0.5
	Гомогенат+цитрат+КСI	-	1.36±0.11	29±1.5
	Гомогенат+цитрат+АТФ	-	0.4± 0.05	11.6±0.8
	Гомогенат+цитрат+АТФ+КСI	-	0.68±0.05	23.1±1.4

Примечание: цитрат - в концентрации 10⁻⁴ М, в вариантах с гомогенатом пролин не добавлен.

Полученные данные показывают, что при внесении в инкубационную среду хлористого калия активность пролиноксидазы в корешках удваивается. При исключении из среды инкубации пролина и внесении в нее цитрата синтезируется значительное количество глутамата и в еще большей степени пролина.

Синтез указанных аминокислот происходит еще интенсивнее при

Таблица 4. Влияние некоторых эффекторов на пролиноксидазную активность мозга крыс

Варианты опыта	Активность фермента, мкМ глу на 1 г ткани	Образование глу из цитрата, мкМ	Образование про из цитрата, мкМ
Полная среда	3.30±0.25		
Полная среда+КСI	1.65±0.14		
Гомогенат+цитрат		5.7±0.6	0
Гомогенат+цитрат+КС		4.9±0.5	0.20±0.02
Гомогенат+цитрат+АТФ		6.5±0.6	0
Гомогенат+цитрат+АТФ+КСI		3.3±0.3	0.5±0.02

Примечание: в вариантах с гомогенатом пролин отсутствует.

внесении в инкубационную среду помимо хлористого калия также АТФ. Эти результаты можно объяснить функционированием цикла Кребса и снабжением субстратами (α-кг, глутамат) для биосинтеза пролина.

Образование пролина в присутствии хлористого калия можно объяснить активирующим влиянием этого соединения на активность П5КР, аналогично ферменту галофита, активность которого в условиях солевого стресса в листьях этого растения возрастает в несколько раз, в то время как *in vitro* она существенно не меняется при концентрации $\text{NaCl} = 0.1 \text{ M}$ [11].

Для сравнения ниже приводятся данные о влиянии тех же эффлекторов на ПО мозга крыс (табл.4).

Как видим, в мозге крыс синтез ПО полностью отличается от такового в тканях гороха. В присутствии КСl ингибируется окисление пролина и снижается содержание глутамата. Наличие же АТФ в отсутствие хлористого калия, наоборот, приводит к увеличению содержания глутамата, образуемого из цитрата.

ЛИТЕРАТУРА

1. Григорян А.Б., Агаджанян А.Х. Биолог. журн. Армении, 46, 2, 215-219, 1993.
2. Гудвин Т., Мерсер Э. Введение в биохимию растений. М., 1986.
3. Гукасян Дж.Г., Агаджанян А.Х. Биолог. журн. Армении, 41, 307-312, 1988.
4. Манташян Э.А. Биолог. журн. Армении, 37, 1, 46-50, 1984.
5. Adams E. Annu. Rev. Biochem., 49, 1005-1061, 1980.
6. Dendinger S., Brill W.J. J. Bacterio, 103, 144-452, 1970.
7. Hems R., Stubbs M., Krebs N.A. Biochem J., 107, 807-815, 1968.
8. Jonson A.V., Streker H.J. J. Biol. Chem., 237, 1876-1881, 1962.
9. Laishley E.I., Berlohr R.W. J. Bacteriol., 96, 322-329, 1968.
10. Newell S.L., Brill W.J. J. Bacteriol, 111, 375-382, 1972.
11. Treichel S. Ber. Dtsch. Bot. Ges., 92, 73-85, 1979.

Поступила 10. VIII. 1999