

ПРОЛИНОКСИДАЗА И ПИРРОЛИН-5-КАРБОКСИЛАТ ДЕГИДРОГЕНАЗА ФАСОЛЕВОЙ ЗЕРНОВКИ И ИХ РЕГУЛЯТОРНЫЕ СВОЙСТВА

М.С. МАРТИРОСЯН, А.Х. АГАДЖАНИЯ

Ереванский государственный университет, кафедра биохимии, 375049

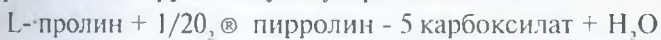
Выявлена роль аргинина в качестве модулятора пролиноксидазы (ПО) и пирролин-5-карбоксилат дегидрогеназы (П5КД). Низкие концентрации его стимулируют активность ферментов, а высокие, наоборот, полностью ингибируют их активность. Обнаружена сильная стимуляция активности ферментов катаболизма пролина L-цитруллин как с НАД⁺, так и с НАДФ⁺. Установлено, что глюкоза и фруктоза являются отрицательными модуляторами ПО и П5КД. Удалось 50% активности ферментов личинок и 25% активности ферментов жуков перевести из осадка в надосадок. Фракционированием пролиноксидазы сульфатом аммония активность фермента обнаружена в осадочной фракции 30%-ного насыщения гомогената.

Ցույց է տրվել արգինինի դերը որպես պրոլինօքսիդազի (ՊՕ) և պիրրոլին-5-կարբօքսիլատ դեհիդրոգենազի մոդուլատոր: Նրա ցածր կոնցենտրացիաները խթանում են ֆերմենտների ակտիվությունը, իսկ բարձր կոնցենտրացիաները ընդհակառակը ճնշում նրանց ակտիվությունը: Հայտնաբերվել է ֆերմենտների ակտիվության ուժեղ խթանում ցիտրուլինով ինչպես օքսիդացված ՆԱԴ-ի, այնպես էլ ՆԱԴՖ-ի մասնակցությամբ: Հաստատվել է, որ գլյուկոզը և ֆրուկտոզը համարվում են ՊՕ-ի և Պ5ԿԴ-ի բացասական մոդուլատորներ: Հաջողվել է թրթուրների ֆերմենտի ակտիվության 50% և բզեզների ֆերմենտի ակտիվության 25% անցկացնել նստվածքից վերնստվածք: Տարբեր հագեցմամբ ամոնիումի սուլֆատով ֆրակցիոնացնելիս պրոլինօքսիդազի ակտիվությունը հայտնաբերվել է 30% հագեցման տիրույթում:

The role of arginin has been defined as a modulator of proline oxidase (PO) and pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase. Low concentration of arginin stimulates the activity of enzymes, whereas its high concentration depress its activity. High stimulation of enzymes of proline degradation activity has been observed both with citrulline and NAD⁺ and NADP⁺. 25% of enzyme activity of beetles and 50% of enzyme activity of larvae has been successfully transferred from sediment into supernatant. This enzyme has been discovered in the supernatant fraction of 30% saturated homogenate during fractionation of proline oxidase with sulphate ammonium.

*Фасолевая зерновка - пролиноксидаза - пирролин-5-карбоксилат
дегидрогеназа - эффекторы катаболизма*

Окисление пролина осуществляется пролиноксидазой (ПО) и пирролин-5-карбоксилат дегидрогеназой (П5КД). ПО, используя в качестве акцептора кислород, катализирует следующую реакцию:



ПО найдена и очищена в 300 раз у бактерий, дрожжей и животных [3]. Фермент ассоциирован с мембранами митохондрий и рибосом и находится в тесной связи с дыхательной цепью. По мнению некоторых исследователей [5], пирролин-5-карбоксилат редуктаза в зависимости от величины pH, соответствующего пула пиримидиновых нуклеотидов и других условий реакции может работать или в направлении биосинтеза, или катаболизма пролина как

пролиндегидрогеназа. Предполагается, что способность фермента осуществлять прямую и обратную реакции обусловлена существованием у него двух каталитических центров связывания для субстратов (пролина и пирролин-5-карбоксилата) и одного - для пиримидиновых нуклеотидов. К этому выводу пришли на основе исследования ферментов у пшеницы и тыквы [8].

Превращение пирролин-5-карбоксилата в глутамат катализируется П5КД по следующей реакции:



Регуляция катаболизма пролина подробно изучена у *Pseudomonas aeruginosa* [7]. Установлено, что в среде роста с пролином и глутаматом полностью отсутствует пролиндегидрогеназа (ПДГ) и обнаружена только активная НАД - зависимая П5КД. При наличии в среде орнитина активность последнего у про - мутантов увеличивается в 3-45 раз.

Настоящая работа посвящена изучению некоторых регуляторных возможностей ферментов окисления пролина - ПО и П5КД у фасолевой зерновки.

Материал и методика. Объектами исследования служили личинки, куколки и жуки фасолевой зерновки *Acanthoscelides obtectus* Say. Гомогенизацию проводили в 0.1 М калий - фосфатном буфере (рН 8.0). Инкубационная среда для определения ПО и П5КД содержала 53 мМ калий - фосфатного буфера (рН 8.0), 0.2 мМ L-пролина, 1.6 мкМ цитохрома С и 4 мкМ НАД⁺. Инкубацию проводили при 37° в течение 60 мин. Реакцию останавливали добавлением 96% - ного охлажденного этанола в соотношении 1:1. Осадок удаляли центрифугированием при 10000 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. Нами изучено влияние различных концентраций L-арг на активность ПО и П5КД у жуков фасолевой зерновки.

Выявлено, что L-арг при низких концентрациях стимулирует активность ферментов катаболизма пролина (табл. 1). При сравнительно высоких концентрациях его (10⁻⁴М) стимуляция активности ферментов не происходит. Согласно данным нашей лаборатории, более высокие концентрации арг приводят к полному ингибированию активности ПО и П5КД. Очевидно, аргинин является модулятором ферментов окисления пролина, оказывая положительный эффект при низких концентрациях и отрицательный - при высоких [2].

Установлен также факт стимулирования активности ПО и П5КД L-цитруллином (табл. 2).

Согласно полученным данным, в инкубационной среде L-цитруллин, как с окисленным кофактором НАД⁺, так и с НАДФ⁺ в одинаковой степени сильно стимулирует активность ферментов катаболизма пролина.

Таким образом, как аргинин, так и цитруллин оказывают стимулирующее влияние на активность ПО и П5КД у жуков фасолевой

зерновки. Это может служить основой для препаратного получения ПО из насекомых, активность у которых более чем в 200 раз превышает таковую мозга крыс [1].

Таблица 1. Влияние различных концентраций L-арг на активность ПО и П5КД у жуков фасоловой зерновки, мкМ глу на 1 г ткани

Варианты	Концентрация L-арг, М	Активность
Опыт		12.9 ± 1.2
L-арг	$1 \cdot 10^{-6}$	15.2 ± 1.3
"	$1 \cdot 10^{-5}$	14.7 ± 1.3
"	$3 \cdot 10^{-5}$	14.2 ± 1.4
"	$5 \cdot 10^{-5}$	14.7 ± 1.3
"	$1 \cdot 10^{-4}$	12.4 ± 1.2

Таблица 2. Стимулирование активности ПО и П5КД в митохондриях жуков L-цитруллином (10^{-6}), мкМ глу на 1 г ткани

Система	Активность ПО и П5КД
L- цитрул. без кофакт.	0.0
L- цитрул.+НАД'	15.0 ± 1.4
L- цитрул.+НАДФ ⁺	15.0 ± 1.3

В следующей серии экспериментов изучали влияние различных концентраций глюкозы и фруктозы на активность ферментов окисления пролина у жуков фасоловой зерновки (табл. 3).

Таблица 3. Влияние различных концентраций глюкозы и фруктозы на активность ПО и П5КД у жуков фасоловой зерновки, мкМ глу на 1 г ткани

Варианты	Концентрация, М	Активность ПО и П5КД
Полная среда		18.9 ± 1.9
Глюкоза	$1 \cdot 10^{-6}$	16.6 ± 1.7
	$1 \cdot 10^{-5}$	14.4 ± 1.9
	$5 \cdot 10^{-5}$	10.3 ± 1.1
	$1 \cdot 10^{-4}$	6.2 ± 0.9
Фруктоза	$1 \cdot 10^{-6}$	15.7 ± 1.6
	$1 \cdot 10^{-5}$	13.2 ± 1.4
	$5 \cdot 10^{-5}$	9.3 ± 1.0
	$1 \cdot 10^{-4}$	5.6 ± 0.5

Полученные данные показывают, что исследованные моносахариды при всех изученных концентрациях подавляют активность ферментов катаболизма пролина. Причем с повышением их концентраций активность ферментов постепенно снижается и при концентрации глюкозы и фруктозы 10^{-4} М активность ферментов подавляется примерно на 70%.

Возникает вопрос: является ли подавление активности ПО и П5КД результатом конкуренции между гликолизом и окислением пролина. Следующая серия экспериментов дала окончательный ответ на этот вопрос. Мы проследили за динамикой расхода глюкозы в инкубационной среде, определяя содержание ее по методу Хагедорна- Йенсена. Полученные

данные приведены в табл. 4.

Таблица 4. Динамика расхода глюкозы в инкубационной среде у личинок фасолевой зерновки

Варианты	Кол-во глюкозы, введенной в инкубационную среду, мг	Кол-во сахара, определенное по методу Хagedорна-Йенсена, мг
Опыт	-	0,04
1. ОП+глюкоза	0.02	0.05
2. 	0.20	0.36
3. 	1.0	1.07
4. 	2.0	2.78

Установлено, что в инкубационной среде не происходит уменьшение содержания глюкозы, скорее, наоборот, обнаруживается некоторое увеличение ее содержания. Но это увеличение можно даже приписать к погрешностям метода определения глюкозы. Таким образом, можно предположить, что глюкоза и фруктоза при высоких концентрациях (10^{-4} М) являются отрицательными модуляторами ферментов окисления пролина.

Далее нами сделаны попытки изолировать ПО и П5КД с помощью гельфильтрации. Следует отметить, что некоторые авторы пытались очистить ПО, однако их работы не увенчались успехом. Обработка митохондрий печени животных тритоном $\times 100$ и фракционирование экстракта привело к разделению активности ПО от активности 4-гидроксипролиноксидазы [4]. Авторы заключают, что ПО не поддается очистке.

Мы применяли различные системы для перевода ПО и П5КД из осадочной фракции в надосадочную.

Как видно, 50% активности ферментов личинок и 25% активности ферментов жуков с помощью калий-фосфатного буфера переведены из осадка в надосадок (табл. 5).

Таблица 5. Применение различных систем для перевода ферментов окисления пролина из осадка в надосадочную жидкость у жуков и личинок фасолевой зерновки, мкМ глу на 1 г ткани

Растворитель ферментов		Фракции		
		Целый гомогенат	Осадок	Надосадок
Жуки	EDTA+KCl	15.5 $\pm$ 1.4	13.4 $\pm$ 1.2	2.7 $\pm$ 0.14
	Калий-фосфатный буфер, pH 8.0	19.4 $\pm$ 1.7	15.3 $\pm$ 1.4	4.7 $\pm$ 0.35
Личинки	EDTA+KCl	8.8 $\pm$ 0.72	4.5 $\pm$ 0.31	2.1 $\pm$ 0.18
	Калий-фосфатный буфер, pH 8.0	12.1 $\pm$ 0.98	7.3 $\pm$ 0.65	6.7 $\pm$ 0.61

Смесь EDTA+KCl в этом отношении значительно уступает калий-фосфатному буферу.

Осуществлено фракционирование ферментов окисления пролина сульфатом аммония на различных стадиях метаморфоза фасолевой зерновки.

Таблица 6. Фракционирование ПО и П5КД сульфатом аммония на различных стадиях метаморфоза фасолевой зерновки, мкМ глу на 1 г ткани

Степень насыщения гомогената сульфатом аммония, %	Активность ПО и П5КД		
	Личинки	Куколки	Жуки
30	13.3±1.3	8.6±0.71	23.4±1.8
50	1.2±0.1	0.8±0.05	2.1±0.2
65			

Как видно из табл. 6, на всех стадиях метаморфоза фасолевой зерновки ферменты окисления пролина осаждаются при 30%-ном насыщении гомогената и обнаруживаются в осадочной фракции.

Нам не удалось обнаружить активность ферментов катаболизма пролина в осадках, полученных при 50% и 65%-ном насыщении сульфатом аммония.

ЛИТЕРАТУРА

1. Агаджанян А.Х. Док. дисс., Ереван, 1990.
2. Гукасян Дж. Г., Агаджанян А.Х. Биол. журн. Армении, 41, 4, 307-312, 1988.
3. Adams E., Frank L. Ann. Rev. Biochem., 49, 1005, 1980.
4. Kramar R., Fitscha P. Enzymologia, 39, 101-108, 1970.
5. Krishna R.V., Belstein P., Leisinger T. Biochem. J., 181, 1, 223, 1979.
6. Mazelis M., Creveling R.K. Phytochemistry, 13, 3, 559, 1974.
7. Meile L., Soldati L. Leinsinger. Arch. Microbiol., 132, 182-189, 1982.
8. Rena A.B., Splittstoesser W.E. Phytochemistry, 14, 3, 657, 1975.

Поступила 16.IV.2001