

## ФЕРМЕНТЫ БИОСИНТЕЗА ПРОЛИНА В РАЗЛИЧНЫХ ОРГАНАХ САЗАНА *CYPRINUS CARPIO*

А.Х. АГАДЖАНЯН, З.С. МИНАСЯН, М.А. ДАВТЯН

*Ереванский государственный университет, кафедра биохимии, 375049*

Установлено, что максимальная активность ферментов биосинтеза пролина обнаруживается в почках сазана. Во всех органах эффективное трансаминирование орнитина происходит с  $\alpha$ -КГ (кетоглутарат), а в сердце и жабрах трансаминирование с пируватом и оксалоацетатом не происходит. По сравнению с НАДН, НАДФН как кофактор пирролин-5-карбоксилат редуктазы (П5КР) гораздо эффективен. Ферменты биосинтеза пролина почек и печени сазана резко отличаются по влиянию на них ионов двухвалентных металлов. При гельфильтрации на сефадексе G-150 в почках сазана обнаружено по два изофермента орнитин- $\alpha$ -трансаминаза (ОТ) и П5КР.

Հաստատվել է, որ պրոլինի կենսասինթեզին մասնակցող ֆերմենտները մաքսիմալ ակտիվություն ցուցաբերում են ծածան ձկան երիկամներում: Բոլոր օրգաններում էֆեկտիվ տրանսամինացում տեղի է ունենում  $\alpha$ -ԿԳ-ից, սակայն սրտում և խոիկներում պիրուվատով և օքսալոացետատով տրանսամինացում տեղի չի ունենում: Պիրոլին-5-կարբօքսիլատ ռեդուկտազի (Պ5ԿՐ) համար առավել էֆեկտիվ կոֆակտոր է համարվում ՆԱԴՖՆ, քան ՆԱԴՆ: Ծածան ձկան երիկամների և լյարդի պրոլինի կենսասինթեզին մասնակցող ֆերմենտները եապես տարբերվում են մետաղների իոնների նկատմամբ ցուցաբերած հատկություններով: Սեֆադեքսով հելֆիլտրացիայի միջոցով ծածան ձկան երիկամում հայտնաբերվել են օրնիտին- $\alpha$ -տրանսամինազի (ՕՏ) և Պ5ԿՐ-ի համար երկուական իզոֆերմենտ:

It has been approved that the enzymes of proline biosynthesis manifest maximal activity in the kidney of sazan. Effective transamination in all organs occurs with  $\alpha$ -CG, but transamination with pyruvate and oxaloacetate doesn't occur in the heart and in the gills. NADPH is more effective cofactor for pyrroline-5-carboxylate reductase (P5CR) than NADH. The enzymes of proline biosynthesis in the kidney and in the liver of sazan considerably differ in terms of influence of various iron's ions. Pairwise isoenzymes of ornitine- $\alpha$ -transaminase (OT) and P5CR have been discovered during gel filtration with sefadex in the kidney of sazan.

*Пролин - орнитин- $\alpha$ -трансаминаза - пирролин-5-карбоксилат редуктаза -  
почки - печень - сазан*

Биосинтез пролина у микроорганизмов, растений и животных осуществляется двумя известными путями: глутаматным и орнитиновым, включающим образование пролина из аргинина и цитруллина. Начальные реакции обеих путей приводят к образованию общих ключевых промежуточных продуктов: L- полуальдегида глутаминовой кислоты и продукта его спонтанной циклизации L-пирролин-5-карбоксилата (П5К). Предшественник пролина орнитин по сравнению с глутаминовой кислотой изучен хорошо. Данные по биосинтезу пролина у рыб отсутствуют.

Синтез пролина из орнитина и глутамата в митохондриях, выделенных из падальной мухи *Aldrichino grahani*, изучен Вадано [7]. Было осуществлено клонирование человеческой П5КС (пирролин-5-карбоксилат синтаза),

бифункционального энзима, имеющего  $\alpha$ -глутамилиназную и глутамилфосфатредуктазную активность. Данный регион ДНК длиной 26907 Да кодирует полипептид с 795 аминокислотными остатками. Были определены заболевания человека, причиной которых является дефицит фермента: общая гиперлаксация, кожная эластичность, катаракта, умственная отсталость с гипераммонемией, низкое содержание пролина, цитруллина [5].

Из хрусталика глаза быка и крысы выделена и очищена почти до гомогенного состояния П5КР. Установлено, что фермент у последних состоит из восьми субъединиц с молекулярной массой каждой до 300 000.

П5КР в качестве кофактора использует либо НАДН, либо НАДФН, а иногда оба кофактора. Так, для высокоочищенной П5КР из *Clostridium* кофактором служит НАДН [4].

Доказано превращение аргинина в пролин в молочной железе лактирующих крыс [8].

Была выявлена взаимосвязь между аргиназой и ферментами биосинтеза пролина у тутового шелкопряда [3].

Наша работа посвящена изучению влияния различных эффекторов на ферменты биосинтеза пролина в различных органах сазана *Cyprinus carpio*.

**Материал и методика.** Объектом исследований служила рыба сазан (*Cyprinus carpio*) семейства карповых отряда карпообразных массой от одного до полутора кг.

Инкубационная смесь (3 мл) содержала 100 мкмоль L-орн, 20 мкмоль  $\alpha$ -КГ, 100 мкмоль калий-фосфатного буфера pH-7.6 и 0.5 мл гомогената. Инкубацию проводили при 38° в течение 1 часа. За это время *про* среды под действием ОТ превращался в П5К. Затем в среду добавляли 4 мкмоль НАДН и 0.5 мл свежего гомогената, смесь инкубировали еще 15 мин. Под действием П5КР, присутствующей в гомогенате, П5К превращается в *про*. Реакцию останавливали 20%-ной ТХУ (если *про* определяли химическим методом). Пробы центрифугировали при 8000 об/мин в течение 10 мин, после чего определяли *про* как хроматографическим, так и химическим методом.

Химическое определение *про* проводили по Блюменкрантцу [6]. Чувствительность метода составляла 1 мкг. К 1 мл образца добавляли 1 мл нингидринового реагента (3 г нингидрина в 180 мл ледяной уксусной кислоты и 20 мл формалина). Смесь кипятили 1 мин при 100° или 4 мин при 75°, охлаждали льдом и измеряли окраску на ФЭК при 470 нм. В качестве стандарта применяли *про* в концентрации 2 мкг/мл.

Осаждение проводили 30%-ным сульфатом аммония. После центрифугирования в оставшийся остаток добавляли 45%-ный сульфат аммония, а затем 60%-ный.

Гель-фильтрацию экстрактов для изучения изоэнзимного спектра ферментов биосинтеза *про*, полученных после 30-минутного центрифугирования при 25000 об/мин, проводили на колонке с сефадексом (G-150). На колонку наносили 3-4 мл экстракта 5%-ного гомогената. Уравновешивание и элюцию осуществляли 0.005M трис - HCl буфером, pH 7.4. Скорость элюции - 30 мм/час, объем фракций - 5 мл.

**Результаты и обсуждение.** Нами изучено влияние концентрации гомогената почек на активность ферментов биосинтеза пролина.

Выявлено, что максимальный выход фермента достигается при 5%-ной концентрации гомогената (табл. 1). В дальнейших экспериментах нами использован именно 5%-ный гомогенат.

В следующей серии экспериментов изучали ферменты биосинтеза пролина (ОТ и П5КР) в различных органах сазана. Полученные данные (табл.

2) свидетельствуют о том, что активность ферментов в почках в 15 раз превышает таковую в изученных органах (печень, сердце, жабры, кровь). Минимальную активность обнаружили в крови (0.32 мкМ).

Таблица 1. Влияние концентраций гомогената почек на активность ферментов биосинтеза пролина, мкМ на 1 г свежей ткани

Концентрация гомогената, %	Активность
5	6.7±0.5
10	3.9±0.3
15	2.7±0.3
20	2.7±0.4

Сравнивая эти данные с имеющимися в литературе, можно заметить, что активность ферментов биосинтеза пролина в почках сазана почти в 4-5 раз ниже, чем таковая в почках крыс, а активность ферментов в печени ниже почти на один порядок [2].

Таблица 2. Ферменты биосинтеза пролина в различных органах сазана, мкМ на 1 г свежей ткани

Органы и ткани	Активность
Почки	6.5±0.4
Печень	0.42±0.05
Сердце	0.74±0.07
Жабры	0.42±0.04
Кровь	0.32±0.03

Нами изучена внутриклеточная локализация ферментов биосинтеза пролина почек сазана (табл. 3).

Таблица 3. Внутриклеточная локализация ферментов биосинтеза пролина почек, мкМ на 1 г свежей ткани

Фракции	Активность
Гомогенат	6.2±0.4
Надосадок	4.7±0.2
Осадок	0.76±0.05

Данные таблицы показывают, что ферменты биосинтеза пролина обнаруживаются в надосадочной фракции гомогената, полученной при центрифугировании 27000g.

В следующей серии экспериментов изучали влияние различных субстратов на активность биосинтеза пролина в различных органах сазана (табл. 4).

Согласно данным табл., процесс биосинтеза пролина во всех органах сазана протекает с наибольшей эффективностью, когда субстратами для него служат орнитин и α-КГ. Наименьшая активность обнаруживается, когда в качестве кетокислоты выступает щавелево-уксусная кислота (ЩУК). В сердце и жабрах биосинтез пролина с пируватом и ЩУК не осуществляется. Таким

образом, из изученных органов лишь в почках протекает интенсивный биосинтез пролина в присутствии изученных нами кетокислот. Эти данные полностью согласуются с данными нашей лаборатории, полученными при изучении различных органов нормальных, беременных и лактирующих крыс [1].

Таблица 4. Влияние различных кетокислот на активность ферментов биосинтеза пролина в различных органах сазана, мкМ на 1 г свежей ткани

Органы	Субстраты	Активность
Почки	Орнитин, αКГ	6.1±0.3
	Орнитин, пируват	1.8±0.1
	Орнитин ШУК	0.25±0.01
Печень	Орнитин, αКГ	0.69±0.03
	Орнитин, пируват	0.39±0.02
	Орнитин ШУК	0
Сердце	Орнитин, αКГ	0.9±0.06
	Орнитин, пируват	0
	Орнитин ШУК	0
Жабры	Орнитин, αКГ	0.64±0.03
	Орнитин, пируват	0
	Орнитин ШУК	0

Данные таблицы показывают, что трансаминирование орнитина во всех органах сазана интенсивно осуществляется с α-КГ, а в сердце и в жабрах с пируватом и оксалоацетатом вовсе не осуществляется. В почках сазана орнитин трансаминируется с исследованными нами кетокислотами.

Далее изучалось влияние кофакторов НАДН и НАДФН на активность ферментов биосинтеза пролина в различных органах сазана (табл. 5).

Таблица 5. Влияние различных кофакторов на активность ферментов биосинтеза пролина в различных органах сазана, мкМ на 1 г живой ткани

Органы	Кофакторы	Активность
Почки	НАДН	5.28±0.3
	НАДФН	8.14±0.06
Печень	НАДН	0.71±0.06
	НАДФН	1.59±0.1
Сердце	НАДН	1.14±0.07
	НАДФН	1.37±0.09
Жабры	НАДН	0.7±0.06
	НАДФН	1.14±0.08
Мозг	НАДН	0
	НАДФН	1.36±0.09

Во всех органах без исключения НАДФН служил лучшим кофактором фермента П5КР по сравнению с НАДН, более того, в мозгу сазана с НАДН фермент не проявлял никакой активности.

Мы изучали также влияние кофакторов на проявление ферментов биосинтеза пролина почек и печени во фракциях гомогената, полученных осаждением сульфатом аммония. Полученные данные приведены в табл. 6, 7.

По данным таблиц, преимущество НАДФН как кофактора, очевидна и во фракциях, полученных осаждением сульфатом аммония. Максимальная активность биосинтеза пролина обнаруживается при 30%-ном осаждении, причем активность ферментов биосинтеза пролина в почках в надосадке 30%-ной фракции в 2 раза превышает таковую в осадке. А в печени даже активность надосадочной фракции несколько уступает таковой в осадке. Таким образом, выявляется различное проявление свойств ферментов биосинтеза пролина почек и печени.

Таблица 6. Влияние различных кофакторов на ферменты биосинтеза пролина почек сазана во фракциях, полученных осаждением сульфатом аммония

Степень насыщения сульфатом аммония, %	Фракции	Кофакторы	Активность	Распредел. активностей, %
30	Гомогенат	НАДН	6.5±0.6	100
		НАДФН	9.7±0.8	100
	Осадок	НАДН	0.7±0.06	10.8
		НАДФН	2.0±0.07	20.6
45	Надосадок	НАДН	0.56±0.04	8.6
		НАДФН	1.8±0.1	18.6
	Осадок	НАДН	0.57±0.04	8.8
		НАДФН	0.9±0.06	9.3
60	Надосадок	НАДН	0.5±0.03	7.7
		НАДФН	0.76±0.06	7.8
	Осадок	НАДН	0.56±0.04	8.6
		НАДФН	0.8±0.05	8.2
Надосадок	НАДН	0.4±0.03	6.2	
	НАДФН	1.0±0.08	10.3	

Таблица 7. Влияние различных кофакторов на ферменты биосинтеза пролина печени сазана во фракциях, полученных осаждением сульфата аммония, мкМ на 1 г свежей ткани

Степень насыщения сульфатом аммония, %	Фракции	Кофакторы	Активность	Распредел. активностей, %
30	Гомогенат	НАДН	0.93±0.07	100
		НАДФН	2.1±0.15	100
	Осадок	НАДН	0.25±0.015	27.8
		НАДФН	0.52±0.04	24.8
45	Надосадок	НАДН	0.31±0.025	34.4
		НАДФН	0.47±0.03	22.4
	Осадок	НАДН	0.17±0.013	18.9
		НАДФН	0.73±0.06	34.8
60	Надосадок	НАДН	0	0
		НАДФН	0.17±0.013	8.1
	Осадок	НАДН	0.08±0.007	8.9
		НАДФН	0.13±0.011	6.2
Надосадок	НАДН	0.04±0.005	4.4	
	НАДФН	0.11±0.01	5.2	

Ферменты биосинтеза пролина почек и печени сазана отличаются также

тем, что в печени их активность обнаруживается в 2.5 раза больше при 30%-ном осаждении по сравнению с активностью (20%) в почках.

Полученные данные показывают, что в почках сазана все изученные нами ионы (за исключением кобальта) стимулируют активность ферментов биосинтеза пролина, в печени же, за исключением марганца, все остальные ионы либо не стимулируют, либо ингибируют указанные ферментативные активности (табл. 8).

Таблица 8. Влияние ионов различных металлов на ферменты биосинтеза пролина в печени и почках сазана, мкМ на 1 г свежей ткани

Органы	Ионы металлов	Концентрация, мкМ	Активность
Почки	Опыт	5	6.4±0.5
	Mn <sup>2+</sup>	5	8.8±0.8
	Cd <sup>2+</sup>	5	8.8±0.7
	Fe <sup>2+</sup>	5	8.1±0.6
	Fe <sup>3+</sup>	5	8.8±0.8
	Co <sup>2+</sup>	5	6.4±0.4
Печень	Опыт	5	0.7±0.04
	Mn <sup>2+</sup>	5	1.05±0.08
	Cd <sup>2+</sup>	5	0.7±0.03
	Fe <sup>2+</sup>	5	0
	Fe <sup>3+</sup>	5	0
	Co <sup>2+</sup>	5	0

В следующей серии экспериментов изучалось влияние различных концентраций ионов металлов (Cd<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>) на ферменты биосинтеза пролина в почках и в печени сазана (табл. 9).

Таблица 9. Влияние различных концентрации ионов металлов на ферменты биосинтеза пролина в печени и почках сазана, мкМ на 1 г свежей ткани

Органы	Ионы	Концентрация, мкМ	Активность
Почки	Опыт		6.0±0.5
	Cd <sup>2+</sup>	2	8.6±0.7
	Cd <sup>2+</sup>	4	8.8±0.7
	Cd <sup>2+</sup>	6	9.6±1.1
	Cd <sup>2+</sup>	8	6.8±0.6
	Mn <sup>2+</sup>	2	11.1±1.0
	Mn <sup>2+</sup>	4	9.19±1.0
	Mn <sup>2+</sup>	6	9.07±1.0
	Mn <sup>2+</sup>	8	1.07±0.05
Печень	Опыт		0.77±0.04
	Cd <sup>2+</sup>	2	2.68±0.2
	Cd <sup>2+</sup>	4	2.86±0.3
	Cd <sup>2+</sup>	6	0.71±0.03
	Cd <sup>2+</sup>	8	2.68±0.2
	Mn <sup>2+</sup>	2	11.3±1.1
	Mn <sup>2+</sup>	4	1.83±0.08
	Mn <sup>2+</sup>	6	1.77±0.09
	Mn <sup>2+</sup>	8	0.77±0.04

Данные таблицы 9 свидетельствуют, что в печени минимальная активность ферментов биосинтеза пролина проявляется при 6 мкМ Cd<sup>2+</sup>.

Таблица 10. Использование различных изоэнзимов для биосинтеза пролина в почках сазана, мкМ на 1 г свежей ткани

Изоэнзимы		Активность
ОТ	П5КР	
I	I	0.16±0.013
I	II	0.026±0.0025
II	I	0.028±0.003
II	II	0.01±0.001

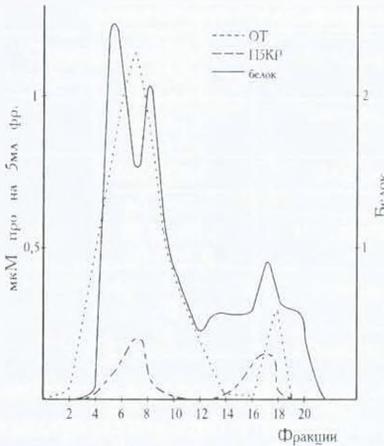


Рис. 1. Изоэнзимы ОТ и П5КР в почках сазана.

Ионы  $Mn^{2+}$  в почках при 8 мкМ на 90% ингибируют активность ферментов биосинтеза пролина. Подобное явление обнаруживается и при биосинтезе пролина печени. Однако ионы  $Mn^{2+}$  в концентрации 2мкМ в наибольшей степени стимулируют активность биосинтеза как в почках, так и в печени. Дальнейшее увеличение концентрации этого двухвалентного металла приводит к подавлению активности ферментов биосинтеза пролина.

Для дополнительного уточнения наличия изоэнзимов биосинтеза пролина была воспроизведена система с использованием различных комбинаций ОТ и П5КР (табл. 10). Наиболее интенсивный синтез пролина наблюдался при совместном функционировании I изоэнзима ОТ с I изоэнзимом П5КР.

Мы изучали изоэнзимный спектр ОТ и П5КР при гель-фильтрации на сефадексе G150 (рис. 1).

Как видно из рис. 1, при гель-фильтрации обнаружены по два изоэнзима ОТ и П5КР.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Агаджанян А.Х., Арутюнян Л.М. Биолог. журн. Армении, 32, 12, 1179-1184, 1979.
2. Агаджанян А.Х., Давтян М.А. Биолог. журн. Армении, 27, 5, 19-23, 1974.
3. Давтян М.А., Агаджанян А.Х. Биолог. журн. Армении, 35, 8, 651-636, 1982.
4. Adams E. Biochem. 49, 1005-1061, 1980.
5. Aral B., Schlenzig J.S., Liu G., Kamoun P. C-R-Acag-Sci-III, 319, 171-178, 1996.
6. Blumenkrantz N. Clin. Biochem., 13, 177-183, 1980.
7. Wadano A. Experientia., 36, 1028-1029, 1980.
8. Yip M.C., Knox W.E. Biochem. J., 127, 893-899, 1972.

Поступила 04.XII.2000