ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ЭФФЕКТОРОВ НА АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ БИОСИНТЕЗА ПРОЛИНА ФАСОЛЕВОЙ ЗЕРНОВКИ

М.С. МАРТИРОСЯН, А.Х. АГАДЖАНЫАН, А.А. АГАДЖАНЫАН, Н.Т. ГУКАСЯН,
А.М. КАРАПЕТЯН

Ереванский государственный университет, кафедра биохимии, 375049

Установлено стимулирующее влияние различных органических кислот и аминокислот на активность ферментов биосинтеза пролина у жуков фасолевого зерновки *Acanthoscelides obtectus* Say. Низкие концентрации цитрата и фумарата особенно сильно стимулируют процесс биосинтеза пролина. Изучено влияние окисленных нуклеотидов и цитрата на фракции гомогената жуков при высаливании сульфатом аммония. Установлено стимулирующее влияние гомогенатов стебельков и корешков гороха, снабжающих восстановленную форму НАДФН в качестве кофактора фермента пирролин-5-карбоксилат редуктазы (H5КР), на процесс биосинтеза пролина у фасолевого зерновки.

Ուսումնասիրվել է տարբեր օրգանական թթուների և ամինաթթուների խթանող ազդեցությունը պրոլինի կենսասինթեզի ֆերմենտների վրա լոբու ընդակերի բզեզներում *Acanthoscelides obtectus* Say. Զիտրատի և ֆումարաթթվի ցածր կոնցենտրացիաները խթանում են պրոլինի կենսասինթեզի պրոցեսը: Ուսումնասիրվել է օքսիդացված նուկլեոտիդների և ցիտրատի ազդեցությունը բզեզների հոմոգենատի ամոնիումի սուլֆատով հագեցված ֆրակցիաների վրա: Սահմանվել է լոբոի ցողունիկների և արմատիկների հոմոգենատի խթանող ազդեցությունը պրոլինի կենսասինթեզի ֆերմենտների վրա լոբու ընդակերի բզեզների մոտ: Շնորհիվ նշված հոմոգենատների պենտոպաֆոսֆատային ցիկլի բարձր ակտիվության, պրոլինի կենսասինթեզը մատակարարվում է վերականգնված ՆԱՂՖՒ-ով, որը հանդիսանում է որպես պիրոլին-5-կարբօքսիլատ ռեդուկտազի կոֆակտոր:

Stimulated influence of different organic acids and aminoacids on activity of enzymes of proline biosynthesis in haricot beetlefly *Acanthoscelides obtectus* Say has been determined. Low concentration of citrate and fumarate is strongly stimulated the process of proline biosynthesis. The influence of oxidized nucleotides and citrate on fraction of beetlefly homogenate, received by salted ammonium sulfate has been studied. Stimulated influence of homogenates of stems and rootlets, which provides with HADFH as cofactor for pyrroline-5-carboxylate reductase, on process of proline biosynthesis has been established.

Пролин - орнитин - орнитинтрансаминаза - пирролин-5-карбоксилат - фасолевого зерновка

Орнитинтрансаминаза (ОТ) пекарских дрожжей, являющаяся одним из ферментов орнитинового пути биосинтеза пролина, была очищена в 10 раз с выходом фермента 7%, включая стадию очистки протаминсульфатом. Фермент оказался весьма нестабильным, и его активность слабо ингибировалась аминокислотами с разветвленной цепью [4]. Изучены свойства кристаллической ОТ из *Bacillus sphaericus* [5] с молекулярной массой 85000 дальтон по

седиментации и 8000 по гельфильтрации, состоящей из двух субъединиц с молекулярной массой 41000 дальтон и имеющей треониновый N-концевой остаток. Шионо с сотрудниками [6] из хрусталика глаза крыс была выделена и очищена почти до гомогенного состояния пирролин-5-карбоксилат редуктаза (П5КР), K_m относительно НАДН-0,62мМ и НАДФН-0,031мМ. Этот фермент состоит из восьми субъединиц, молекулярная масса каждой из которых составляет 30000.

Выявлены один изоэнзим ОТ и два изоэнзима П5КР в молочной железе крыс как у контрольных, так и у лактирующих. Получены ОТ и П5КР со степенью очистки 178 и 124 и с выходом ферментов 10 и 8,8% соответственно, с применением аффинной хроматографии на голубой сефарозе с последующей гельфильтрацией на сефадексе G-150 [2].

Выявлены по два изоэнзима ОТ на всех стадиях метаморфозы фасоловой зерновки, два изоэнзима П5КР у личинок и один - у куколок и жуков [1].

Осуществлена очистка ОТ и П5КР личинок и куколок фасоловой зерновки и получены ферменты со степенью очистки 333 и 291 и с выходом 57,9 и 57,0% у личинок и 100; 116 и 38,9; 36,2% у куколок соответственно [2].

В настоящем сообщении приводятся данные по регулированию активности ферментов биосинтеза пролина на различных стадиях метаморфозы фасоловой зерновки *Acanthoscelides obtectus* Say.

Материал и методика. Объектом исследования служили личинки и жуки фасоловой зерновки *A. obtectus* Say. Продолжительность развития яиц при 28° 7 дней. При этой температуре и 75%-ной влажности воздуха личиночная и кукольная стадии длятся 30 и 4-5 дней соответственно. Самка начинает откладывать яйца через 2-3 ч после выхода из куколки в течение 10-12 дней.

Активность ферментов биосинтеза пролина определяли в инкубационной среде, содержащей 50мкМ L-орнитина, 20мкМ α -кетоглутарата (α -КГ), 100мкМ калий-фосфатного буфера (рН 7,4), 1 мкМ пиридоксаль-5-фосфата и 0,5 мл гомогената. Инкубацию проводили при 37° в течение 1 ч. За это время орнитин среды под действием ОТ превращается в П5К. Затем в среду добавляли 4мкМ НАДН или НАДФН и 0,5 мл свежего гомогената, смесь инкубировали еще 15 мин. Под действием П5КР П5К превращается в пролин. Реакцию останавливали 20%-ной холодной ТХУ. Пробы центрифугировали при 8000 об/мин в течение 10 мин и определяли пролин химическим методом Блюменкранца [3].

Результаты и обсуждение. Нами изучено влияние различных субстратов и органических кислот на активность ферментов биосинтеза пролина у жуков фасоловой зерновки. Полученные данные приведены в табл. 1.

Данные таблицы показывают, что цитрат почти в 10 раз (кофактор НАДФ⁺), а фумарат (кофактор НАД⁺) в 4 раза стимулируют активность ферментов биосинтеза пролина. С другой стороны, цитрат ингибирует активность ферментов, когда кофактором служит окисленный НАД. Витамин С, являясь акцептором электронов, конкурирует с окисленной формой НАДФ⁺ и ингибирует активность ферментов биосинтеза пролина более чем на половину.

Следующая серия экспериментов была посвящена изучению влияния некоторых органических кислот и аминокислот на ферменты биосинтеза пролина у жуков фасоловой зерновки (табл. 2).

Таблица 1. Влияние субстратов и органических кислот на активность ферментов биосинтеза пролина у жуков фасолевого зерновки, мкМ про на 1г ткани

Субстраты	Кофактор	Органические кислоты	Активность
L-орн	НАДФ ⁺	-	0,78±0,12
	НАДФ ⁺	цитрат	5,99±0,83
	НАДФ ⁺	фумарат	3,03±0,34
	НАД ⁺	-	2,02±0,24
	НАД ⁺	цитрат	1,12±0,13
	НАД ⁺	фумарат	2,81±0,31
	НАДФН	-	4,15±0,55
	НАДФН	цитрат	6,39±0,62
L-орн + α - КГ	НАДФ ⁺	-	2,13±0,25
	НАДФ ⁺	витамин С 5мкМ	1,57±0,16
		10мкМ	1.03±1,3

Таблица 2. Влияние органических кислот и аминокислот на ферменты биосинтеза пролина у жуков фасолевого зерновки, мкМ про на 1г ткани

Варианты	НАДФ ⁺	НАДФН	
L-орн + α -КГ	2,13±0,21	2,45±0,25	
L-орн + α -КГ	+ цитрат	4,17±0,42	3,81±0,34
	+ малсинат	4,17±0,44	1,29±0,12
	+ фумарат	6,06±0,61	0
	+ аспарат	4,46±0,20	3,96±0,34
	+ глутамат	3,66±0,33	4,46±0,41

Согласно таблице, изученные нами органические кислоты (за исключением фумарата и малеината) и аминокислоты усиливают процесс биосинтеза пролина как с кофактором НАДФ⁺, так и с НАДФН. Примечательно, что органические кислоты с двойными связями, особенно фумарат, сильнее стимулируют процесс биосинтеза пролина в присутствии окисленной НАДФ⁺, а с восстановленной формой НАДФН фумарат полностью подавляет процесс. Сравнительно сильное стимулирование биосинтеза пролина аспаратом и слабое глутаматом (с кофактором НАДФ⁺) можно объяснить трансаминированием аспартата с α -КГ, приводящим к образованию глутамата, который имеет преимущество над экзогенным глутаматом в глутаматдегидрогеназной реакции, снабжающей НАДФН и приводящей к усилению процесса биосинтеза пролина. Далее нами изучено влияние различных концентраций органических кислот на ферменты биосинтеза пролина у жуков фасолевого зерновки (табл. 3).

Цитрат, особенно при низких концентрациях, усиливает процесс синтеза пролина.

Аналогичное влияние оказывает и фумарат. Малеиновая кислота же стимулирует процесс лишь при концентрации 1 мкМ, а при высоких концентрациях она полностью подавляет процесс биосинтеза пролина.

Таблица 3. Влияние различных концентраций органических кислот на ферменты биосинтеза пролина у жуков фасолевой зерновки, мкМ про на 1г ткани (кофактор НАДФ⁺)

Органические кислоты	Концентрация, М	Активность
Без эффектора цитрат	-	2,12±0,28
	1·10 ⁻⁶	7,51±0,68
	5·10 ⁻⁶	7,82±0,70
	1·10 ⁻⁵	6,04±0,64
	2·10 ⁻⁵	3,84±0,37
	5·10 ⁻⁵	3,25±0,31
фумарат	1·10 ⁻⁶	6,86±0,66
	5·10 ⁻⁶	6,42±0
	1·10 ⁻⁵	5,63±0,55
	2·10 ⁻⁵	5,54±0,53
	5·10 ⁻⁵	4,71±0,45
малеинат	1·10 ⁻⁶	3,26±0,29
	5·10 ⁻⁶	0
	1·10 ⁻⁵	0
	2·10 ⁻⁵	0
	5·10 ⁻⁵	0

Нами изучено также влияние органических кислот на ферменты биосинтеза пролина в условиях, когда в качестве кетокислот выступали α-КГ и пируват (ПВ) (табл. 4).

Таблица 4. Влияние органических кислот на ферменты биосинтеза пролина у жуков фасолевой зерновки, мкМ про на 1г ткани

Варианты	Кофакторы	
	НАДФ ⁺	НАДФН
L-орн + α-КГ + цитрат	4,16±0,38	6,34±0,53
	4,53±0,41	-
	3,94±0,32	3,05±0,36
L-орн + ПВ + цитрат	3,84±0,34	3,86±0,38
	4,35±0,42	-
	1,72±0,14	1,56±0,13

Данные таблицы свидетельствуют о том, что изоцитрат, по сравнению с цитратом, стимулирует активность ферментов биосинтеза пролина, имеет преимущества при функционировании фермента как с α-КГ, так и с ПВ.

Осуществлено фракционирование ферментов биосинтеза пролина и изучено влияние окисленных нуклеотидов на их активность в осадке и надосадке, полученных при 30%-ном насыщении сульфатом аммония (табл. 5).

Очевидно, что при 30%-ном насыщении гомогената жуков сульфатом аммония в осадке обнаруживается слабая активность ферментов биосинтеза

пролина (кофактор НАДФ⁺), в то время как в надосадке наблюдается усиление активности ферментов более чем в 4 раза. Это объясняется тем, что в надосадке еще сохраняются все ферменты пентозного цикла, осуществляющие синтез НАДФН, являющиеся кофактором для одного из ферментов биосинтеза пролина - П5КР. Подтверждению этого посвящены следующие серии экспериментов.

Таблица 5. Влияние окисленных нуклеотидов на ферменты биосинтеза пролина осадка и надосадка гомогената жуков, полученных при 30%-ном насыщении сульфатом аммония, мкМ про на 1г ткани

Варианты	Кофакторы	Фракции	Активность
гомогенат 30%-ное насыщение	НАДН		9,74±1,02
	НАДН	осадок	1,07±0,11
	НАДН	надосадок	3,92±0,34
	НАД'	осадок	0,35±0,06
	НАД'	надосадок	0,71±0,06
	НАДФ ⁺	осадок	0,71±0,05
		надосадок	3,24±0,35

Известно, что в проростках растений при отсутствии фотосинтеза кофактор НАДФН снабжается пентозофосфатным циклом. Исходя из этого, мы добавили в инкубационную среду гомогенат проростков гороха и проследили за процессом биосинтеза пролина (табл. 6). Гомогенат корешков и стебельков не обладает ферментативной активностью.

Таблица 6. Влияние гомогената проростков гороха на ферменты биосинтеза пролина личинок и жуков фасолевой зерновки, мкМ про на 1г ткани

Варианты		Активность		
		Гомогенат ⊗	Гомогенат ⊗ + гомогенат корешков	Гомогенат ⊗ + гомогенат стебельков
Личинки - 1	НАДФН	28,43±2,11	36,31±2,81	40,22±3,51
	НАДФ'	6,86±0,65	19,6±1,31	23,5±2,12
	НАДФ ⁺ + цитрат	19,61±1,21	26,5±2,01	24,5±2,14
Жуки - 2	НАДФН	2,49±0,24	2,20±0,24	5,12±0,48
	НАДФ'	0,92±0,12	1,20±0,12	1,82±0,14
	НАДФ ⁺ + цитрат	3,21±0,32	3,51±0,32	3,86±0,37

Примечание: Знак ⊗ принимает значения: 1 - личинок, 2 - жуков.

Данные таблицы показывают, что при сочетании гомогената личинок с гомогенатами корешков и стебельков гороха значительно стимулируется процесс биосинтеза пролина у личинок. Это особенно выражено при наличии окисленной формы НАДФ.

Однако гомогенат корешков не оказывает особого влияния на гомогенат жуков, в то время как при наличии гомогената стебельков активность ОТ и

П5КР удваивается как с окисленной, так и с восстановленной формой НАДФ. Примечательно, что у жуков, по сравнению с личинками, окисленная форма НАДФ с цитратом практически не стимулирует активность ферментов биосинтеза пролина.

Нами изучено также влияние цитрата и окисленных нуклеотидов на фракции, полученные при высаливании сульфатом аммония (табл. 7).

Таблица 7. Влияние цитрата и окисленных нуклеотидов на ферменты биосинтеза пролина во фракциях гомогената жуков, полученных при высаливании сульфатом аммония, мкМ про на 1г ткани

Фракции	Кофакторы	Органическая кислота	Активность
Целый гомогенат	НАДФ ⁺	-	0
Осадок от насыщения 30%-ного	НАДФ ⁺	цитрат	1,51±0,14
	НАДФ ⁺	-	0
	НАДФ ⁺	цитрат	0,10±0,01
	НАД ⁺	-	0,15±0,01
	НАД ⁺	цитрат	0,06±0,01
50%-ного	НАДФ ⁺	-	0
	НАДФ ⁺	цитрат	0,21±0,02
	НАД ⁺	-	0,16±0,01
65%-ного	НАД ⁺	цитрат	0,06±0,008
	НАДФ ⁺	-	0
	НАДФ ⁺	цитрат	0
	НАД ⁺	-	0
65%-ного	НАД ⁺	цитрат	0
	НАД ⁺	-	0
	НАД ⁺	цитрат	0

Выявлено, что стимулирующее свойство цитрата выражается не только на уровне целого гомогената жуков, но и в осадках, полученных при 30%- и 50%-ном насыщениях. Осадок от 65%-ного насыщения не обладает активностью ферментов биосинтеза пролина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Агаджанян А.Х. Биолог. журн. Армении, 40, 4, 289-294, 1987.
2. Агаджанян А.Х. Док. дис., с. 331, Ереван, 1990.
3. Blumenkrantz N. Chem. Biochem., 13, 177-183, 1980.
4. Matsuzawa T., Wakatsuka T. Vitamins (Japan), 51, 7-10, 1977.
5. Misono H., Toyawa S., Soda K. J. Bacteriol., 148, 43-50, 1981.
6. Shiono T., Kador P. P., Kinoshito J. J. Biochem. Biophys. Acta., 881, 72-78, 1986.

Поступила 04.IX.2003