

УДК 591.1.05

ИЗОЛИРОВАНИЕ ФЕРМЕНТОВ БИОСИНТЕЗА ПРОЛИНА МОЗГА КРЫС И ИХ РЕГУЛЯТОРНЫЕ СВОЙСТВА

Манукян И.П., Агаджанян А.Х., *Арутюнян А.В.

Ереванский государственный университет;

**Институт биохимии АН АрмССР, Ереван*

Разработан способ частичной очистки орнитинтрансминазы и пирролин-5-карбоксилат-редуктазы мозга крыс. Получена орнитинтрансминаза со степенью очистки 62,5 и с выходом 8,7%. Используя фракционирование на ципокроне (голубая сефароза), удалось получить пирролин-5-карбоксилатредуктазу со степенью очистки 684, с выходом 5,4%. АТФ, п-хлормеркурибензоат, йодацетат и некоторые аминокислоты (аспартат, аспарагин, аланин) заметно ингибируют процесс биосинтеза пролина с участием очищенных орнитинтрансминазы и пирролин-5-карбоксилатредуктазы. Ингибирующий эффект АТФ значительно ослабевает при функционировании пирролин-5-карбоксилатредуктазы с кофактором NADPH. Мощным ингибитором процесса биосинтеза пролина мозга крыс является NADP.

* * *

Превращение орнитина в пролин через пирролин-5-карбоксилат доказано многочисленными исследованиями, выполненными на инфузориях, молочной железе крыс, дождевом черве, фасольевой зерновке [1—3]. Биосинтез пролина этим путем осуществляется путем последовательного действия двух ферментов — L-орнитин: 2 оксокислота-аминотрансферазы (КФ 2.6.1.13) и 1-пирролин-5-карбоксилат: NAD⁺ - оксидоредуктазы (КФ 2.6.1.13).

Выявлено, что в мозгу мышей аргинин транспортируется внутрь синапсом с дальнейшим превращением в орнитин, служащий предшественником для синтеза ГАМК, глутамата и пролина [4]. Имеются сведения, что активность орнитинтрансминазы (ОТ) высока в отделах мозга крыс, ответственных за память (кора больших полушарий, гипоталамус, гиппокамп), в то время как значительная активность пирролин-5-карбоксилатредуктазы (П5КР) обнаруживается во всех участках мозга [5].

Имеется ограниченное число работ по выделению и характеристике ОТ и П5КР. Очищена и получена в кристаллическом состоянии ОТ из печени крыс [6], и изучены ее некоторые физико-химические свойства.

Получена также ОТ из пекарских дрожжей со степенью очистки 10 и выходом 7%. Слабыми ингибиторами фермента являются аминокислоты с разветвленной цепью и, в первую очередь, L-валин. K_m для орнитина и α -КГ соответственно равны 12,2 и 6,7 мМ [7].

Очищена П5КР сетчатки глаз быка, кофактором которой являются как NADH, так и NADPH. Фермент ингибируется АТФ [8]. Указанный фермент выделен также из хрусталика глаз крысы и очищен почти до гомогенного состояния [9]. Установлено, что фермент представляет из

себя октомер с величиной M , каждого мономера 30 кД. Ингибитором П5КР из хрусталика глаз крыс являются ионы Hg , Cu , n -хлормеркурибензоат (n -ХМБ), NADP и АТР.

Целью настоящей работы является очистка ферментов биосинтеза пролина (ОТ и П5КР) мозга крыс и изучение их регуляторных свойств.

Материалы и методы

Объектом исследования служили белые крысы линии *Wistar* массой 150—180 г.

Для выявления изоэнзимного спектра ферментов биосинтеза пролина гомогенизировали 4—5 г мозга крыс в 0,1 М калий-фосфатном буфере pH 7,5. Гомогенат центрифугировали при 27000 g в течение 30 мин и надосадочную жидкость после ряда промежуточных этапов обработки подвергали гель-фильтрации на сефадексе G-150.

Активность ОТ и П5КР, а также содержание пролина определялось по методу, описанному нами ранее [10]. При исследовании влияния адениловых нуклеотидов и аминокислот на процесс биосинтеза пролина реакционная смесь (3 мл) содержала 50 мкмоль орнитина, 20 мкмоль α -КГ, 100 мкмоль калий-фосфатного буфера pH 7,4, 1 мкмоль пиридоксаль-5-фосфата, 0,5 мл ферментного препарата, адениловые нуклеотиды — $2 \cdot 10^{-4}$ М, аминокислоты — $2,6 \text{—} 15,6 \cdot 10^{-3}$ М. Содержание белка в пробах определяли по методу Lowry [11].

При определении активности ОТ по количеству образующегося из П5К пролина к препаратам ОТ добавляли фракции, обладающие наибольшей активностью П5КР.

Результаты и обсуждение

Ранее нами сообщалось, что ферменты биосинтеза пролина в основном локализованы в осадке, полученном после центрифугирования гомогената при 27000 g , в то время как в надосадочной фракции обнаруживается менее 20% этой активности [12]. С целью дальнейшей солиubilизации ферментов нами был испытан ряд приемов.

Таблица 1

Влияние различных сред гомогенизации на степень экстракции ферментов биосинтеза пролина (орнитинтрансминаза и пиридоксаль-5-карбоксидатредуктаза) мозга крыс, в мкмоль пролина/г ткани/ч

Условия опыта	Гомогенат	$\%$	Надосадочная жидкость	$\%$	Осадок	$\%$
Калий-фосфатный буфер (0,1М)	$8,52 \pm 0,52$	100	$1,66 \pm 0,10$	19,2	$6,02 \pm 0,51$	70,6
Калий-фосфатный буфер (0,02М) ЭДТА (0,5мМ), глицерин 10% (v/v)	$8,89 \pm 0,52$	100	$4,82 \pm 0,21$	54,2	$3,95 \pm 0,18$	44,4

Наиболее удовлетворительные результаты получаются при применении калий-фосфатного буфера (0,02М), содержащего ЭДТА и глицерин. При этом, как видно из данных, приведенных в табл.1, в растворимой фракции обнаруживается более половины ферментативных активностей (ОТ и П5КР).

Последующими экспериментами удалось доказать, что добавлением к среде ЭДТА и глицерина из осадка гомогената солюбилизируется дополнительное количество идентичных ферментов, не отличающихся поведением при гель-фильтрации на сефадексе G-150. На рис. 1 и 2 показано, что при гель-фильтрации надосадочной жидкости гомогената, приготовленного на 0,1 М калий-фосфатном буфере, также как и экстракта осадка, полученного добавлением к среде ЭДТА и глицерина, проявляются по одному пику активности ОТ (максимальная активность во фракциях 6,7). Характерно, что активность П5КР осадка значительно превышает ОТ активность, тогда как в растворимой фракции отмечается обратная закономерность, что указывает на то, что П5КР в отличие от ОТ является преимущественно партикулярным ферментом.

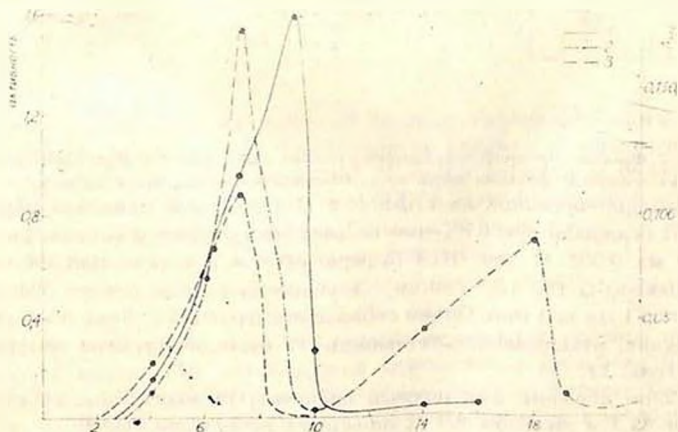


Рис. 1. Фракционирование орнитинтрансаминазы и пирролин-5-карбоксилатредуктазы надосадочной жидкости мозга крыс на сефадексе G-150. 1—активность орнитинотрансминазы; 2—активность пирролин-5-карбоксилатредуктазы; 3—белок. По оси ординат слева—содержание пролина в мкмоль/мг белка/ч.; справа—содержание белка. По оси абсцисс—номера фракций

В дальнейшем мы осуществляли очистку указанных ферментов.

Очистка ОТ мозга крыс. Очистка ОТ осуществлена с использованием следующих процедур, выполненных при 0—4° (табл.2).

Экстракция фермента. 4-5 г мозга гомогенизировали в 15 мл 0,1М калий-фосфатного буфера pH 7,5, и гомогенат центрифугировали при 27000g, в течение 30 минут.

Высаливание сульфатом аммония. Активность фермента сосредотачивалась в осадке, полученном в интервале насыщения 50-60%. При этом, в результате удаления балластных белков, У.А. повышалась более чем в 3 раза.

Диализ и термообработка. Препарат подвергали диализу в течение ночи против 0,1 М калий-фосфатного буфера pH 7,5. Белковый осадок удаляли центрифугированием при 12000g в течение 10 мин, а надосадочную жидкость (7 мл) обрабатывали 1 мин в присутствии 50 мкг пиридоксаль-5-фосфата и 5 мкМ α -КГ при 60°. При этом У.А. фермента увеличивалась почти вдвое.

Рис. 2. Фракционирование орнитинтрансаминазы и пирролин-5-карбоксилатредуктазы из осадочной фракции мозга крыс. Обозначения те же, что и на рис. 1.

Фракционирование на сефадексе G-150. После тепловой обработки фермент осаждали при 65%-ном насыщении сульфата аммония, растворяли в 3 мл 0,005 М трис-HCl буфера, pH 7,4 и переносили на колонку с сефадексом G-150 (2,5×40 см). Элюцию проводили тем же буфером со скоростью 1 мл за 3 мин. Объем собираемых фракций— 5 мл, было собрано 21 фракция, максимальная активность ОТ была обнаружена во фракциях 8 и 9 (рис. 1).

Таким образом, был получен препарат ОТ мозга крыс со степенью очистки 62,5 и выходом 8,7%, лишенной активности П5КР.

Очистка П5КР мозга крыс. Очистка П5КР осуществлена следующими этапами при температуре 22°.

Экстракция фермента. 4—5 г мозга гомогенизировали в 15 мл 0,02М калий-фосфатного буфера pH 7,4, содержащего 0,5 мМ ЭДТА и 10%-ный глицерин (V/V) и центрифугировали при 12000 g в течение 30 мин.

Фракционирование на голубой сефарозе (Cibachron blue). Для этого фермент предварительно осаждали сульфатом аммония в интервале 60—80%. При 60%-ном насыщении суспензию выдерживали 1 ч на магнитной мешалке, после чего осадок удаляли центрифугированием, насыщение надосадочной жидкости доводили до 80% и выдерживали опять на магнитной мешалке 1 ч. Полученный осадок растворяли в минимальном количестве 0,02 М калий-фосфатного буфера pH 7,4, содержащего 0,5 мМ ЭДТА и 10%-ный глицерин, и переносили на колонку с голубой сефарозой (1 × 20 см), уравновешенную 0,02 М калий-фосфатным буфером pH 7,4,

содержащим 0,5 мМ ЭДТА и 10%-ный глицерин. Элюцию проводили 0,02М калий-фосфатным буфером pH 7,4 со скоростью 0,5 мл/мин. Были собраны 20 фракций по 3 мл. В результате удалось повысить активность фермента почти в 35 раз.

Таблица 2

Очистка орнитинтрансаминазы мозга крыс

Этапы очистки	Общий белок (мг)	Общая активность (мкмоль пролина/ч)	У.А. (мкмоль пролина/мг белка/ч)	Выход фермента (%)	Степень очистки
Гомогенат	54,1	8,62	0,15	100	
Надосадочная жидкость, полученная при центрифугировании гомогената при 27000 g	15,3	5,84	0,38	67,7	2,53
Высаливание 50-65% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2,24	2,85	1,27	33,0	8,46
Тепловая обработка при 60°	1,21	2,98	2,46	34,5	16,4
Высаливание 65% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и фракционирование на сефадексе G-150 (фракции 8 и 9)	0,08	0,75	9,37	8,7	62,5

Фракционирование на сефадексе G-150. Активные фракции с колонки с ципокроном (фракции 5,6) переносили на колонку с сефадексом G-150 (2,5 × 40 см), уравновешенную 0,02 М калий-фосфатным буфером (pH 7,4), содержащим 0,2 М KCl и 0,5 мМ ЭДТА. Элюцию проводили этим же буфером со скоростью 0,35 мл/мин. Собрана 21 фракция, объем каждой — 5 мл. П5КР выходила в основном во фракциях 6, 7 (рис. 1).

Из данных табл. 3 следует, что получена П5КР мозга крыс со степенью очистки 684 и выходом 5,4%.

Ранее нами сообщалось, что процесс биосинтеза пролина на уровне гомогената мозга крыс ингибируется адениловыми нуклеотидами (АТР, АДР, АМР) [12]. Ингибирующий эффект АТР на процесс биосинтеза пролина был значительно более выражен, если в качестве кофактора П5КР использовали NADH, а не NADPH. Аналогичное влияние на активность фермента оказывали аспартат, аспарагин, α-аланин. Ингибирующий эффект последних сохранялся также, когда в инкубационную среду вносили кетокислоты, трансаминирование или реаминирование которых приводило к синтезу указанных аминокислот (в частности пируват, оксалоацетат или пируват с сульфатом аммония).

Интересно было выяснить, каково влияние указанных соединений на очищенные ОТ и П5КР, изолированные из надосадочной фракции мозга крыс. Полученные экспериментальные данные, приведенные на рис. 3 а, б, свидетельствуют о том, что влияние АТР и аминокислот (аспартат, аспарагин и α-аланин) на очищенные ферменты биосинтеза пролина аналогично ингибированию фермента на уровне гомогената мозга крыс. Характерно, что в отличие от экспериментов, проведенных на гомогенатах мозга, АМР и АДР не оказывали влияния на биосинтез пролина при участии очищен-

ных ОТ и ПСКР. Из этого следует заключить, что наблюдаемое при использовании гомогенатов ингибирование процесса в присутствии АМР и АДР, вероятно, обусловлено их фосфорилированием с образованием АТР.

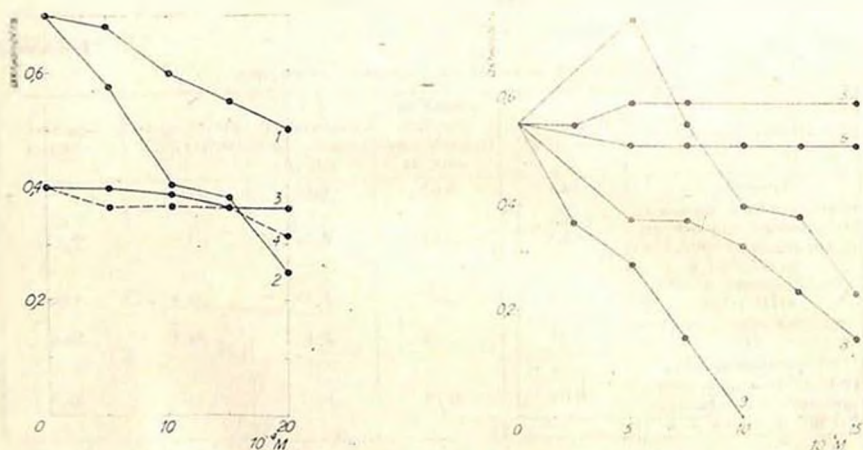


Рис. 3. Влияние адениннуклеотидов (а) и некоторых аминокислот (б) на биосинтез пролина при использовании частично очищенных препаратов орнитинтрансминазы и пирролин-5-карбоксилатредуктазы. 1 — АТР (кофактор NADPH), 2 — АТР (кофактор NADH), 3 — АДР, 4 — АМР, 5 — β -аланин, 6 — серин, 7 — аспарагин, 8 — аспарат, 9 — α -аланин. По оси абсцисс — концентрация ингибитора, по оси ординат — содержание пролина (μ моль/мг белка/ч)

Очистка пирролин-5-карбоксилатредуктазы мозга крыс

Таблица 3

Этапы	Общий белок (мг)	Общая активность (мкмоль пролина/мг, ч)	Удельная активность (мкмоль пролина/белка/ч)	Выход фермента (%)	Степень очистки
Гомогенат	61,2	12,1	0,19	100	
Надосадоочная жидкость	18,3	7,0	0,38	57,8	2
Высаливание (NH_4), SO_4 при 60-80%-ном насыщении	7,1	3,3	0,46	27,2	2,4
Фракционирование на циклокроне (фракции 5,6)	0,25	1,7	7,0	14,4	36,8
Фракционирование на сефадексе G-150 (фракции 6,7)	0,005	0,65	130	5,4	684

Ингибирование процесса биосинтеза пролина АТР, очевидно, имеет важное значение в регуляции балансирования процессов энергообразования и биосинтеза пролина. Не исключено, что в условиях максимального биосинтеза, АТР, когда насыщается электронно-транспортная система митохондрий, накапливается NADH и создаются оптимальные условия для

биосинтеза пролина. Можно полагать, что с целью предотвращения избыточного биосинтеза пролина в указанных условиях процесс ингибируется АТР.

Изучено влияние *n*-ХМБ и йодацетата на процесс биосинтеза пролина с использованием очищенных ОТ и П5КР (табл. 4). Показано, что *n*-ХМБ и йодацетат ингибируют процесс биосинтеза пролина очищенными ферментами мозга крыс, что свидетельствует о тиоловом характере мозговой П5КР, по аналогии с ферментом из хрусталика глаза [13].

Таблица 4

Влияние *n*-хлормеркурибензоата (*n*-ХМБ) и йодацетата на процесс биосинтеза пролина в мозгу крыс (кофактор пирролин-5-карбоксилатредуктаза — NADH; $n=5$)

Ингибитор	Концентрация 10^{-4} М	Активность (мкмоль/пробу)	Ингибирование (%)
Без ингибитора		0,37	0
<i>n</i> -ХМБ	1,72	$0,21 \pm 0,05$	43,3
	3,43	$0,18 \pm 0,05$	51,4
	6,86	$0,10 \pm 0,025$	73,0
	10,2	$0,09 \pm 0,025$	75,7
	17,1	$0,09 \pm 0,03$	75,7
	34,3	0	100
Йодацетат	1,72	$0,75 \pm 0,14$	33,1
	3,43	$0,61 \pm 0,08$	45,5
	6,86	$0,61 \pm 0,10$	45,5
	10,2	$0,54 \pm 0,09$	51,8
	17,1	$0,54 \pm 0,09$	51,8
	34,3	$0,33 \pm 0,05$	70,5

Так же, как и на уровне гомогената, при использовании частично очищенных ферментов биосинтеза пролина нами установлено сравнительно слабое ингибирование активности П5КР под влиянием АТР (рис. 3, а) и других испытанных нами соединений при функционировании в качестве кофактора фермента NADPH по сравнению с NADH.

Таблица 5

Влияние окисленных нуклеотидов на процесс биосинтеза пролина (мкмоль/пробу)

Окисленный нуклеотид	Кофакторы пирролин-5-карбоксилатредуктазы	
	NADH	NADPH
NAD	$0,40 \pm 0,04$	$0,25 \pm 0,03$
NADP	$0,25 \pm 0,03$	$0,10 \pm 0,05$
	0	0

Окисленные коферменты (NAD и NADP), добавленные в эквимольных с восстановленным NADP концентрациях (по 4 мкМ), вызывали выраженное ингибирование П5КР, конкурируя с NADPH, причем NAD в этом отношении значительно уступал NADPH (табл. 5). Эти данные находятся в полном соответствии с результатами исследований, выполненных на дождевом черве, фасолевой зерновке и молочной железе крыс [1, 13], а также данным литературы, касающимся активности П5КР в гомогенате листьев сои [14] и очищенного до гомогенного состояния фермента из хрусталика глаз крысы [9]. По данным Shiono и соавт. [9], окисленный NAD, в отличие от NADP, на П5КР хрусталика глаза ингибирующего эффекта почти не оказывает. Проведенный при этом кинетический анализ

позволил заключить, что NADP ингибирует активность фермента конкурентным механизмом. Другими исследователями, наоборот, было показано, что NADP оказывает неконкурентное ингибирование П5КР печени крыс [15].

THE ISOLATION OF PROLINE BIOSYNTHESIS ENZYMES FROM RAT BRAIN AND THEIR REGULATORY PROPERTIES

Manukyan I. P., Agadzanyan A. Ch., *Haroutunian A. V.

Yerevan State University, *Institute of Biochemistry,
Academy of Sciences of Armenian SSR, Yerevan

The enzymes of proline biosynthesis ornithine transaminase and pyrroline-5-carboxylate reductase were partially purified from rat brain. The enzymes isolated had degree of purification 62,5 and 684, and yeld 8,7 and 5,4% correspondingly.

It is shown that proline biosynthesis by purified enzyme preparations markedly inhibited by thiol reagents, ATP and some aminoacids (aspartate, asparagine and alanin). The inhibitory action of ATP sufficiently decreased by use of NADPH as coenzyme of pyrroline-5-carboxylate reductase. Oxidized nicotinamide adenine nucleotides, especially NADP, are effective inhibitors of proline biosynthesis, competitive to NADPH.

ЛИТЕРАТУРА

1. Арутюнян Л. М. О взаимосвязи аргиназы и биосинтеза пролина в различных органах крыс. Автореф. канд. дис., Ереван, 1984.
2. Арутюнян Л. М., Агаджанян А. Х., Биол. журн. Армении, т.34, с.176—182, 1981.
3. Заробян Т. Я., Агаджанян А. Х., Давтян М. А. Биол. журн.Армении, т.29, с. 44—50, 1976.
4. Johnson J. L., Roberts E. S. Neurochem., v. 42, p.1123—1126, 1984.
5. Hersfeld A., Mezl V. A., Knox W. E. Biochem. J., v. 166, p. 95—103, 1977.
6. Strecker H. J. J. Biol. Chem., v. 240, p.1225—1230, 1965.
7. Matsuzawa T., Wakatsuki T. Vitamins (Japan), v.52, p.7—10, 1977.
8. Matsuzawa T. Biochem. Biophys. Acta, v.717, p. 215—219, 1982.
9. Shiono T., Kador P. F., Kinoshita J. J. Biochem. Biophys. Acta, v. 881, p. 72—78, 1986.
10. Агаджанян А. Х. Биол. журн. Армении, т. 37, с.40—50, 1985.
11. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. T. J. Biol. Chem., v. 193, p. 265—275, 1951.
12. Манукян И. П., Агаджанян А. Х., Арутюнян А. В. Нейрохимия, т. 6, с. 384—389, 1987.
13. Гаспарян Х. Г. Изoenзимы аргиназы и биосинтеза пролина у дождевого червя *Lumbricus terrestris*, канд. дис., Ереван, 1983.
14. Miller R. M., Stewart R. Phytochemistry, v. 15, p. 1855—1957, 1976.
15. Smith M. E., Greenberg D. M. J. Biol. Chem., v. 226, p. 317—327, 1957.

Поступила 10.06.1989