НЕЙРОХИМИЯ

т. 6, № 3, 1987

УДК 591.1.05

ФЕРМЕНТЫ БИОСИНТЕЗА ПРОЛИНА И РЕГУЛЯЦИЯ ИХ АКТИВНОСТИ В МОЗГУ КРЫС

*МАНУКЯН И. П., АГАДЖАНЯН А. Х., *АРУТЮНЯН А. В.

*Институт биохимии АН АрмССР, Ереван; проблемная лаборатория сравнительной и эволюционной биохимии ЕГУ

Изучены ферменты биосинтеза пролина (орнитинтрансаминаза—ОТА и пирролин-5-карбоксилатредуктаза—П-5-КР) в мозгу крыс, локализованные как в растворимой фракции, так и в осадке, полученном при центрифугировании гомогената. Установлено, что наряду с α-кетоглутаратом (α-КГ), трансаминирование орнитина в мозгу крыс протекает также с пируватом и оксалоацетатом.

АТР, аспартат, аспарагин и аланин являются эффективными ингибиторами ОТА и П-5-КР, причем действие АТР проявляется наиболее отчетливо, если в качестве кофактора П-5-КР используется NADH, а не NADPH.

Во многих органах млекопитающих пролин, в основном, синтезируется из глутамата и орнитина, а также может поступать с кровью в готовом виде. В частности, клетки ЦНС могут обеспечиваться пролином крови [1].

Синтез и катаболизм пролина в мозгу изучены весьма недостаточно. Активность П-5-КР высока в мозгу эмбриона по сравнению с таковой зрелых крыс, а пролиноксидазная активность, наоборот, выше у зрелых животных [2]. Таким образом, в мозгу зрелых крыс деградация пролина происходит с большей скоростью, чем синтез, а в мозгу плода, наоборот, превалирует синтез пролина.

Jonson, Roberts [3] исследовали транспорт аргинина в синаптосомы мозга крыс и установили превращение последнего в орнитин и далее в глутамат, ГАМК и пролин. Концентрация указанных веществ может изменяться как под влиянием ингибирования их синтеза по принципу обратной связи, так и в зависимости от уровня содержания кофакторов.

Давтян и соавт. [4] изучили биосинтез пролина из орнитина, аргинина, цитруллина и глутамата в мозгу эмбрионов, беременных и лактирующих крыс. Показано, что у беременных и лактирующих крыс, наряду с орнитином, биосинтез пролина протекает также из цитруллина, а у эмбрионов—из всех указанных субстратов. Очевидно, цитруллин пред-

варительно превращается в аргинин соответствующими ферментами мозга крыс с дальнейшим образованием пролина.

Цель настоящей работы—изучить некоторые стороны обмена пролина и регуляции активности ферментов, участвующих в этом процессе в мозгу крыс.

Материалы и методы

Объектом исследования служили белые крысы линии *Wistar* массой 150—180 г. Для определения ферментативной активности использовали 20%-ный гомогенат мозга в 0.1 М калий-фосфатном буфере (pH 7,4). Инкубационная смесь (3 мл) содержала 50 мкмоль орнитина, 20 мкмоль α-кетоглутарата (или других кетокислот), 100 мкмоль калий-фосфатного буфера (pH 7.4), пиридоксаль-5-фосфата—1 мкмоль и 0,5 мл 5%-ного гомогената. Инкубацию проводили при 37° в течение 60 мин. За это время орнитин инкубационной среды под действием ОТА превращается в L-Δ'-пирролин-5-карбоксилат (П-5-К). Затем в среду добавляли 4 мкмоль NADH, 0,5 мл свежего гомогената и смесь инкубировали еще 15 мин. Под действием П-5-КР, присутствующей в гомогенате, П-5-К превращается в пролин. Реакцию останавливали 20%-ной ТХУ (для определения активности ферментов биосинтеза пролина и содержания пролина) и 96°-ным холодным этиловым спиртом (для хроматографического определения пролина). Пробы центрифугировали при 8000 об/мин в течение 10 мин и в надосадочной жидкости определяли пролин. Активность ферментов биосинтеза пролина (ОТА и П-5-КР) выражали в мкмоль образовавшегося пролина на 1 г свежей ткани за 60 мин.

Пролин и оксипролин определяли хроматографическим методом [5].

Результаты и обсуждение

На начальном этапе изучения процесса биосинтеза пролина ткани мозга нами было исследовано содержание в ней пролина и оксипролина. Согласно полученным результатам, свободный эндогенный пролин в мозгу крыс накапливается весьма незначительно (0,06 мкмоль/г ткани), а оксипролин вовсе не обнаруживается, что соответствует данным других авторов [6, 7]. Проведенные нами исследования показали, что процесс биосинтеза пролина из глутамата в гомогенатах мозга крыс протекает весьма слабо (образуется 0,072 мкмоль пролина/г ткани/ч), причем лишь в присутствии NADH. По-видимому, в мозгу крыс глутамат превращается в полуальдегид глутаминовой кислоты не путем образования глутамилфосфата [10], а под воздействием П-5-КР, кофактором которой служит восстановленный NAD. Аналогичные данные были получены ранее в отношении печени птиц [8] и в экстрактах жуков фасолевой зерновки [9].

В специальной серии экспериментов нами был изучен биосинтез пролина из орнитина. При подборе оптимальных условий для протека-

ния этого процесса было исследовано влияние различных концентраций орнитина (10—100 мкмоль) и некоторых буферов (K^+-фосфатный, трис-HCl и др.), на активность ОТА и П-5-КР в мозгу крыс. Было обнаружено, что наиболее интенсивно процесс биосинтеза пролина протекает при концентрации орнитина 50 мкМ и инкубации в 0,1 М K^+-фосфатном буфере, pH 7.4 в течение 60 мин.

Таблица 1

Биосинтез пролина (в мкмолях ткани/ч) из орнитина в мозгу крыс в присутствии различных кетокислот и кофакторов (n=5)

Субстраты	Кофакторы	Гомогенат	Надосадочная жидкость	Осадок
α-кетоглутарат	NADH	7,98±1,12	2,33±0,31	5,69±0,85
Пируват	NADH	4,89±0,42	2,63±0,42	2,70±0,55
Оксалоацетат	NADH	1,51±0,09	0,35±0,03	0,60±0,04
α-кетоглутарат	NADPH	7,03±1,02	2,02±0,33	5,70±1,02

Исследовано влияние различных кетокислот (α-КГ, оксалоацетат, пируват)и кофакторов (NADH и NADPH) на биосинтез пролина из орнитина в надосадочной жидкости и осадке, полученном при центрифугировании при 27000 g гомогената мозга. Показано, что трансаминирование орнитина наиболее интенсивно протекает с α-КГ, несколько слабее с пируватом и гораздо хуже с оксалоацетатом (табл. 1). Как видно из приведенных данных, NADPH в качестве кофактора П-5-КР в мозгу несколько уступает NADH по эффективности. Между тем во многих органах установлено преимущество NADH в указанной реакции [11, 12].

Наблюдаемый нами заметный синтез пролина из орнитина в присутствии пирувата наводит на мысль о наличии в мозгу, помимо трансаминазы орнитина с α-КГ, трансаминазы с пируватом. Об этом свидетельствует также тот факт, что, если этот процесс в присутствии α-КГ проявляется, в основном, в осадке, то в присутствии пирувата протекает с одинаковой интенсивностью как в надосадочной жидкости, так и в осадке. В полном соответствии с этими данными находятся результаты серии экспериментов по изучению интенсивности процесса биосинтеза пролина из орнитина в гомогенате мозга при совместном присутствии α-КГ и пирувата в различных количественных соотношениях (табл. 2). Оказалось, что пролин синтезируется из орнитина и α-КГ, взятом в отдельности, слабее, чем в опытах, в которых использовалась смесь эквимолярных количеств α-КГ и пирувата.

В следующей серии экспериментов было изучено влияние ATP, ADP и AMP на активность ОТА и П-5-КР мозга крыс. Полученные данные (рис. 1, 2) выявили, что ATP оказывает ингибирующее влияние на активность обоих ферментов, тогда как ADP и AMP ингибируют лишь активность П-5-КР. Активность же ОТА в этих условиях, напротив, несколько повышается, особенно в присутствии низких кон-

центраций аденинонуклеотидов ($5 \cdot 10^{-5}$ М). Характерно, что ингибирующий эффект ATP на процесс биосинтеза пролина значительно более выражен, если в качестве кофактора П-5-КР используется NADH, а не NADPH.

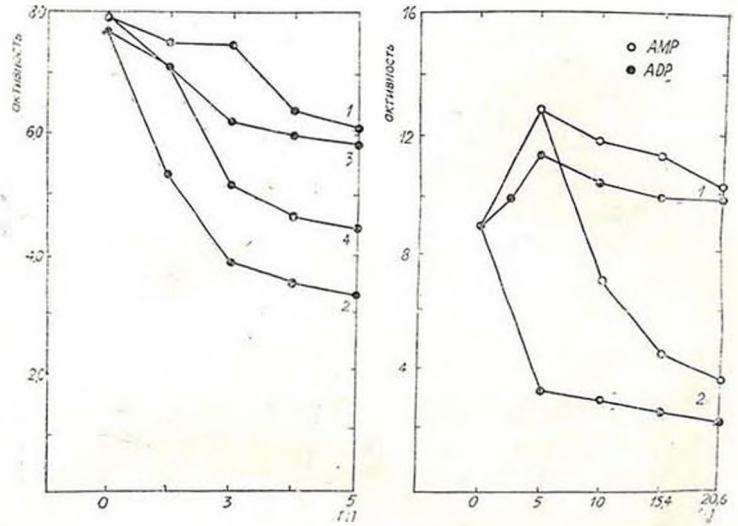

Рис. 1. Влияние ATP на биосинтез пролина (мкмоль/г ткани/ч) в мозгу крыс: *1*—ОТА, кофактор П-5-КР NADPH; *2*—ОТА, кофактор П-5-КР NADH; *3*—П-5-КР, кофактор NADPH; *4*—П-5-КР, кофактор NADH. По оси абсцисс—концентрация ингибитора, 10^{-4} М

Рис. 2. Влияние AMP и ADP на биосинтез пролина (в мкмоль/г ткани/ч) в мозгу крыс: *1*—ОТА; *2*—П-5-КР. В качестве кофактора использовали NADH. По оси абсцисс—концентрация ингибитора, 10^{-5} М

По литературным данным, ATP практически не влияет на NADPH-зависимую активность П-5-КР в сетчатке [13], а у E. coli обнаружено подавление этого процесса лишь при высоких концентрациях ATP [14].

В литературе имеются данные по ингибированию процесса биосинтеза пролина у E. coli аспартатом, глицином, серином и аланином [14]. В связи с этим мы изучали влияние указанных аминокислот, а также аспарагина на процесс биосинтеза пролина мозга крыс (рис. 3, *а*, *б*).

Полученные данные показывают, что в сравнительно высоких концентрациях ($13{,}5$—$26{,}5 \cdot 10^{3}$ М) аспарагин, аспартат и аланин значительно подавляют активность ОТА и П-5-КР. Следует отметить, что ингибирующее влияние аспарагина проявляется даже при более низких концентрациях ($2{,}7 \cdot 10^{-3}$ М). Аспартат в низких концентрациях никакого

влияния на активность обоих ферментов не оказывает. Начиная с $13{,}5 \cdot 10^{-3}$ М концентрации наблюдается ингибирование активности обоих ферментов, участвующих в процессе биосинтеза пролина. Примечательно, что по сравнению с L-аланином, β-аланин вызывает довольно слабое ингибирование активности как ОТА, так и П-5-КР в мозгу

Таблица 2

Биосинтез пролина (в мкмоль/г ткани/ч) из орнитина в гомогенате мозга крыс при различных соотношениях α-кетоглутарата и пирувата (n=6)

Субстраты			Пролин
орнитин (мкМ)	α-кетоглутарат (мкМ)	пируват (мкМ)	
50	50	—	6,42±0,72
50	25	25	7,47±0,84
50	50	50	13,10±1,09
50	100	—	5,37±0,23

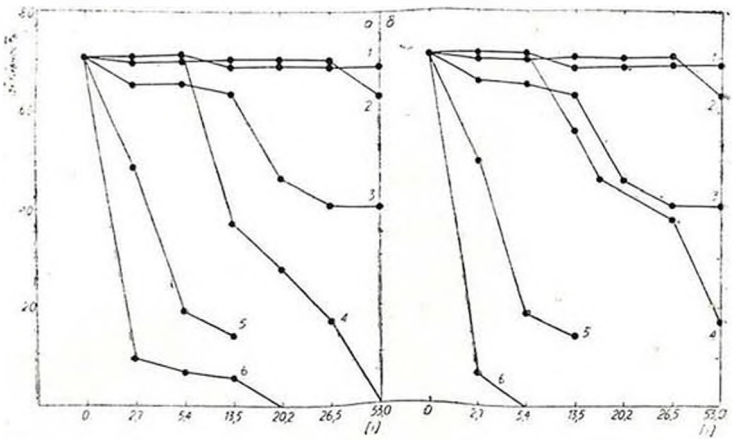

Рис. 3. Влияние некоторых аминокислот на активность ОТА *(а)* и П-5-КР *(б)* (мкмоль П-5-К/г ткани/ч) в мозгу крыс: *1*—глицин, *2*—серин, *3*—β аланин, *4*—аспартат, *5*—аланин, *6*—аспарагин. По оси абсцисс—концентрация аминокислот, 10^{-3} М

крыс. Серин и глицин ни в одной из испытанных концентраций не действуют на процесс биосинтеза пролина в мозгу.

Ингибирование аспартатом и аланином процесса биосинтеза пролина, по-видимому, объясняется интенсивным функционированием в мозгу крыс аспартат- и аланинаминотрансфераз, с которыми орнитинаминотрансфераза не в состоянии конкурировать за α-КГ.

ENZYMES OF PROLINE BIOSYNTHESIS AND REGULATION OF THEIR ACTIVITY IN RAT BRAIN

MANUKYAN I. P., AGADJANYAN A. Kh., *AROUTYUNYAN A. V.

*Institute of Biochemistry, Arm. SSR Acad. Sci., Yerevan
Research Lab. of Comparative and Evolutionary Biochemistry,
Yerevan State University

Activity of ornithine transaminase (OTA) and pyrrolin-5-carboxylate reductase (PCR)—the enzymes of proline biosynthesis that are localized both in soluble fraction and in the pellet—has been studied. Transamination of ornithine in rat brain takes place not only with α-ketoglutarate, but with pyruvate and oxaloacetate as well. ATP, aspartate, asparagine and alanine are potent inhibitors of OTA and PCR; the inhibitory effect of ATP is more pronounced if NADPH is used as a coenzyme of PCR instead of NADH.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Lodato R. E., Smith R. J., Valle D., Phang J. M., Aocki T. T.* Metabolism, v. 30, № 9, p. 908—913, 1981.
2. *Kowaloff E. M., Granger A. S., Phang J. M.* Metabolism, v. 15, № 10, p. 1087—1094, 1976.
3. *Jonson I. Z., Roberts E.* J. Neurochem., v. 42, № 4, p. 1123—1126, 1984.
4. *Арутюнян Л. М., Агаджанян А. Х., Давтян М. А.* Биол. журн. Армении, т. 36, № 2, с. 110—114, 1983.
5. *Hrabetowa E., Tuty L. J.* J. Chromatogr., v. 3, № 2, p. 199—201, 1960.
6. *Blumenkrantz M.* Clin. Biochem., v. 13, № 4, p. 177—183, 1980.
7. *Herzfeld A., Mere V. A., Knox E.* Biochem. J., v. 166, № 1, p. 95—103, 1977.
8. *Давтян М. А., Агаджанян А. Х., Гукасян Дж. Г.* Биол. журн. Армении, т. 37, № 6, с. 467—471, 1984.
9. *Shen T. E., Bird H. R., Sunde M. Z.* Poultry Science, v. 52, p. 676—682, 1973.
10. *Baich A.* Biochim. et biophys. acta, v. 192, № 3, p. 462—467, 1969.
11. *Агаджанян А. Х., Давтян М. А.* Биол. журн. Армении, т. 27, № 5, с. 19—23 1974.
12. *Miller P. M., Stewart C. R.* Phystochemistry, v. 15, № 12, p. 1855—1857, 1976.
13. *Matsuzawa T.* Biochim. et biophys. acta, v. 717, № 2, p. 215—219, 1982.
14. *Hayzen D. J., Moses V.* Biochem. J. v. 173, № 1, p. 207—217, 1978.

Поступила 28. VII 1986