

Г. Т. АДУНЦ

О ПРИРОДЕ SH-ГРУПП, СВЯЗАНЫХ С РЕАКТИВНЫМ ЦЕНТРОМ ЩЕЛОЧНЫХ ФОСФАТАЗ

Из числа известных 650—660 ферментов 180 являются металлосодержащими [6, 7], а более ста — тиоловыми, активность которых сильно подавляется при блокировке находящихся в их активном центре SH-групп [8].

Щелочная фосфатаза рассматривается, с одной стороны, как тиоловый фермент [4, 5], с другой стороны — как металлосодержащий фермент [11].

Работами Вильямса [5] было установлено, что цинк активного центра щелочной фосфатазы присоединен координационной связью как с ферментом, так и с SH-группой. Поэтому автор приходит к убеждению, что цинкосодержащие ферменты являются одновременно тиоловыми ферментами. В настоящее время SH-группы ферментов по степени их реактивности условно подразделяются на три типа: легко реагирующие, вяло реагирующие и «замаскированные» [8, 9]. Характерными для сульфгидрильных групп первого типа являются реакции с нитропруссидом, окислителями типа феррицианида и порфирина, а также с йодацетамидом. SH-группы второго типа не входят во взаимодействие с нитропруссидом, реагируя с более сильными окислителями — йодом, О-йодбензоатом и п-хлормеркурибензоатом (п-ХМБ). Третий тип SH-групп обнаруживается лишь при денатурации белка. При взаимодействии моноiodуксусной кислоты с тиоловыми группами фермента высвобождается галлоидный анион; этот процесс называется алкилированием SH-групп [8].

Тиоловые группы, входя во взаимодействие с ионами металлов, образуют слабодиссоциирующие меркапиды. Высоким сродством к SH-группам обладают одновалентные ионы ртути, серебра, меди, золота и двухвалентные ионы ртути, свинца, меди, кадмия и цинка, а также трехвалентные мышьяк и сурьма.

Из наших предыдущих работ выяснилось, что под влиянием тиоловых реагентов — моноiodуксусной кислоты и п-ХМБ — активность щелочной фосфатазы почек и слизистой оболочки тонких кишок белых крыс возрастает в два-три раза по сравнению с нормой [1].

Цель настоящей работы заключается в выяснении характера SH-групп, находящихся в активном центре щелочной фосфатазы при воздействии двух тиоловых реагентов — моноiodуксусной кислоты и п-ХМБ, отличающихся различной силой действия.

Опыты были поставлены на почках и слизистой оболочке тонких кишок белых крыс. Для определения активности щелочной фосфатазы ис-

пользовались гомогенаты указанных тканей. Инкубация проводилась в мединаловом буфере pH 9.6 в течение 15 мин. при 37°C. В качестве субстрата использовали натриевую соль β -глицерофосфата. Об активности фермента судили по количеству отщепившегося неорганического фосфора, который определялся методом Лоури и Лопеса [10]. Активность фермента выражали в мг фосфора на г свежей ткани. Исследования показали, что активность щелочной фосфатазы почек и слизистой оболочки тонких кишок резко отличается друг от друга: слизистая тонкого кишечника обладает гораздо более высокой ферментативной активностью, чем почки.

Тиоловые реагенты брались в инкубационной среде в эквивалентных количествах. Использовались следующие концентрации тиоловых реагентов: 10^{-2} , $5 \cdot 10^{-3}$, 10^{-3} , $5 \cdot 10^{-4}$, и 10^{-4} М. Предварительными опытами установлено, что приведенные концентрации тиоловых реагентов являются теми оптимальными величинами, которые приводят к изменению активности фермента.

Для серийных опытов в среднем было взято по 10 животных весом в 80—120 г. Активность щелочной фосфатазы почек при 15-и минутной инкубации в норме, без добавления тиоловых реагентов, составляла 2,5—4,0 мг фосфора на г свежей ткани.

Под действием различных концентраций моноiodуксусной кислоты активность щелочной фосфатазы почек претерпевает закономерные изменения. Так, с повышением концентрации моноiodуксусной кислоты от 10^{-4} до 10^{-2} М соответственно повышается активность фермента. Наибольший эффект дает концентрация моноiodуксусной кислоты в 10^{-2} М, удваивая фосфатазную активность (рис. 1). Как видно из рис. 1, различные концентрации п-ХМБ по-разному воздействуют на активность щелочной фосфатазы. Максимальный эффект достигается при концентрации п-ХМБ, равной 10^{-3} М. В этом случае активность фермента возрастает в 3 раза. При дальнейшем увеличении концентрации п-ХМБ ($5 \cdot 10^{-3}$ М) активность фермента снижается по сравнению с максимальным эффектом. При концентрации п-ХМБ в 10^{-2} М фосфатазная активность снижается, доходя до величины в норме.

Активность щелочной фосфатазы слизистой оболочки тонких кишок в 3 раза превышает активность того же фермента почек, составляя 8—10 мг фосфора на г свежей ткани (среднее 10 опытов).

С повышением концентрации моноiodуксусной кислоты в инкубационной среде параллельно повышается активность фермента (рис. 2). Наибольший эффект наблюдается под действием концентрации моноiodуксусной кислоты в 10^{-3} М.

Под влиянием различных концентраций п-ХМБ происходят следующие изменения. Концентрации 10^{-4} — 10^{-3} М прогрессивно повышают активность фермента, а концентрация $5 \cdot 10^{-3}$ М дает такой же эффект, как при концентрации 10^{-4} М. При анализе результатов, приведенных на этих двух рисунках, нетрудно заметить, что изменения активности щелочной фосфатазы как почек, так и слизистой оболочки тонких кишок

под влиянием эквивалентных количеств моноiodуксусной кислоты и п-ХМБ носят неадекватный характер. Приведенные концентрации моноiodуксусной кислоты повышают активность фермента; при этом малые концентрации приводят к незначительным изменениям в активности фермента. Заметное увеличение активности отмечается, начиная от концентраций моноiodуксусной кислоты в 10^{-3} М, достигая максимальной величины при 10^{-2} М.

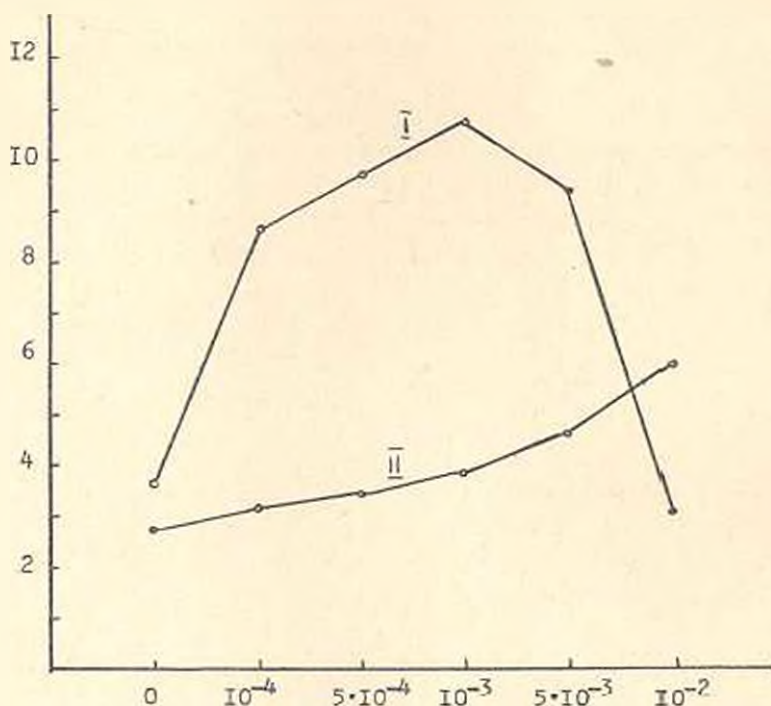


Рис. 1. Возрастающие концентрации реагента в М. I — п-ХМБ, II — моноiodуксусная кислота.

Характер действия различных концентраций п-ХМБ на активность щелочной фосфатазы отличается от эффекта, вызванного такими же концентрациями моноiodуксусной кислоты, а именно: низкая концентрация п-ХМБ (10^{-4} М) увеличивает в два раза активность фермента, в то время как при концентрациях в $5 \cdot 10^{-4}$ и 10^{-3} М эффект меньше по сравнению с эффектом при воздействии п-ХМБ в концентрации 10^{-4} М.

При концентрации п-ХМБ в 10^{-2} М активность фермента почек не только не повышается, а даже проявляет тенденцию к снижению по сравнению с нормой. В то же время, при воздействии на щелочную фосфатазу слизистой оболочки тонких кишок такой же концентрацией п-ХМБ, сохраняется высокий уровень активности фермента, равный активности фермента при концентрации п-ХМБ в 10^{-4} М.

Полученные данные подтверждают результаты наших предыдущих работ [1] о том, что, во-первых, тиоловые реагенты активируют щелочную фосфатазу и, во-вторых, что SH-группы активного центра фермента,

связанные координационными связями с цинком, подавляют активность щелочной фосфатазы. Блокировка тиоловыми реагентами SH-групп, связывающих цинк активного центра фермента, приводит к повышению активности фермента. Отсюда вытекает, что щелочную фосфатазу нельзя причислять к ряду тиоловых ферментов, так как деятельность такого рода ферментов осуществляется SH-группами их активных центров.

Установленный нами факт об ингибирующем влиянии SH-групп на фосфатазную активность свидетельствует о их (SH-групп) определенной роли и участии в регуляции деятельности фермента. В этом, по-видимому, и заключается их физиологическое значение.

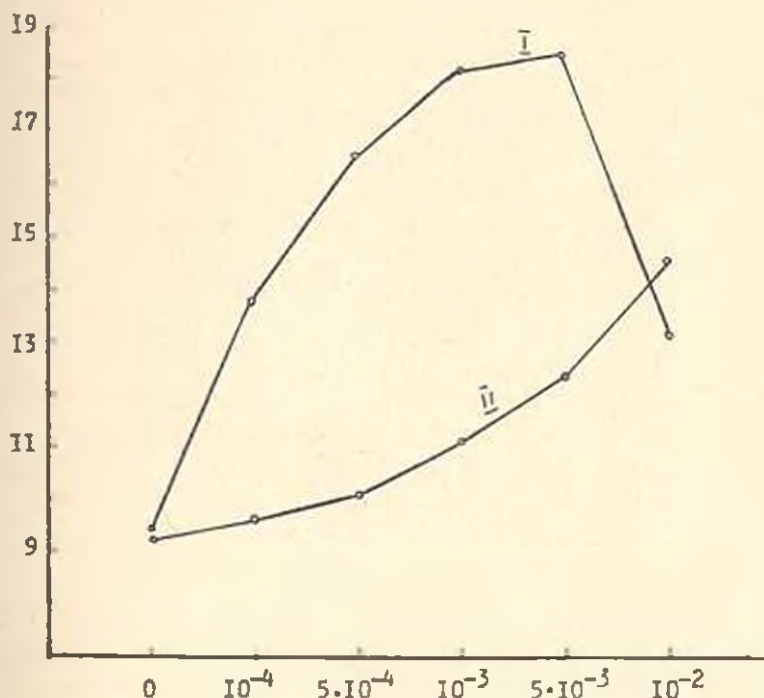


Рис. 2. Возрастающие концентрации реагента и М I — n-XMB, II — монойодуксусная кислота.

Как известно, регуляция активности фермента *in vivo* гораздо сложнее и зависит от многих факторов. В наших предыдущих работах по изучению влияния адреналина и аскорбиновой кислоты на фосфатазную активность было высказано мнение о том, что активация фермента при воздействии адреналином и аскорбиновой кислотой осуществляется, по-видимому, через блокирование SH-групп [2, 3]. В настоящем исследовании установленный нами факт активации фермента (*in vitro*) под влиянием монойодацетата и n-XMB через блокирование SH-групп указывает на правильность понимания механизма осуществления фосфатазной активации *in vivo* при воздействии на фермент адреналином и аскорбиновой кислотой. Далее, полученные данные позволяют судить о том, что монойодуксусная кислота и n-XMB как тиоловые реагенты по эффекту

своего действия не эквивалентны. Моноiodуксусная кислота является более слабодействующим реагентом, который блокирует относительно более реактивные SH-группы, а п-ХМБ, будучи более сильным реагентом, блокирует (в концентрациях $10^{-3} - 10^{-4}$ М) как реактивные, так и вяло реагирующие SH-группы. При дальнейшем повышении концентрации п-ХМБ ($5 \cdot 10^{-3} - 10^{-2}$ М) проявляется двойственный характер действия этого реагента. Наряду с блокированием SH-групп с повышением активности фермента происходят и структурные изменения молекулы фермента, ведущие к падению активности щелочной фосфатазы. Характер кривой воздействия п-ХМБ на активность щелочной фосфатазы является поэтому результатом сложения указанных двух противоположных действий этого реагента. При этом, до концентрации 10^{-3} М превалирует активирование фермента над его деструкцией, а при концентрациях выше 10^{-3} М преобладают деструктивные процессы.

Парадоксальные факты, связанные с тиоловыми ферментами, получены Геллерманом и сотр. [12]. Эти авторы изучали действие Ag^+ и п-ХМБ на активность глутаматдегидрогеназы. Ионы серебра вызывали диссоциацию глутаматдегидрогеназы на субъединицы, вследствие блокирования SH-групп. В то же время, органические соединения ртути не только не вызывали диссоциации этого фермента на субъединицы, но, напротив, резко повышали активность фермента. Авторы не интерпретировали полученные данные.

Таким образом, полученные нами данные относительно активирующего влияния п-ХМБ на щелочную фосфатазу согласуются с данными Геллермана и сотр. [12] об аналогичном воздействии указанного выше тиолового реагента на глутаматдегидрогеназную активность.

В ы в о д ы

Активность щелочной фосфатазы почек и слизистой оболочки кишечника белых крыс претерпевает ряд изменений под влиянием моноiodуксусной кислоты и п-ХМБ.

1. Моноiodуксусная кислота в низких концентрациях (10^{-4} ; $5 \cdot 10^{-4}$ М) не оказывает заметного влияния на активность фермента, в то время как более высокие концентрации ($5 \cdot 10^{-3}$; 10^{-2} М) значительно повышают его активность.

2. Низкие концентрации п-ХМБ (10^{-4} ; $5 \cdot 10^{-4}$; 10^{-3} М) увеличивают активность фермента почти вдвое. Более высокие концентрации ($5 \cdot 10^{-3}$; 10^{-2} М) либо приводят к эффекту, подобному низким концентрациям, либо доводят активность фермента до нормы.

3. SH-группы, подавляющие активность щелочной фосфатазы, по степени их реактивности можно разделить по меньшей мере на две группы, поскольку они проявляют различное отношение к двум отличающимся по силе действия тиоловым реагентам.

Физиологическая роль SH-группы, находящихся в активном центре щелочной фосфатазы и подавляющих ее активность, заключается в регуляции деятельности этого фермента.

Институт биохимии АН АрмССР

Поступило 12.I 1966 г.

Չ. ԱՂՈՐԱՑ

ՀԻՄՆԱՅԻՆ ՖՈՍՖԱՏԱԶԱՅԻ ԻՆԱԿՏԻՎ ԿՆՆՏՐՈՆՆԵՐԸ ԿԱՊՈՂ SH-ԽՄԲԵՐԻ ԲՆՈՒՅԹԻ ՄԱՍԻՆ

Ա մ փ ո փ ու մ

Փորձերը դրվել են սպիտակ առնետների երիկամների և բարակ աղիների լորձաթաղանթի վրա: Ուղղվել է հիմնային ֆոսֆատազայի ակտիվության փոփոխությունը մոնոյոդրացախաթթվի և պարախլորմերկուրի րենդոատի ազդեցության ներքո:

Ռեակցիոն խառնուրդում, մոնոյոդրացախաթթվի և պարախլորմերկուրի րենդոատի կոնցենտրացիաները եղել են՝ 10^{-7} , $5 \cdot 10^{-7}$, 10^{-5} , $5 \cdot 10^{-5}$, և 10^{-3} մոլ: Ուսումնասիրությունից պարզվել է, որ մոնոյոդրացախաթթվի փոքր կոնցենտրացիաները ֆերմենտի ակտիվության մեջ էական տեղաշարժ չեն մտցրել: Մեծ կոնցենտրացիան՝ 10^{-3} մոլ, ֆերմենտի ակտիվությունը բարձրացնում է մոտ երկու անգամ:

Պարախլորմերկուրի րենդոատի փոքր կոնցենտրացիաները խիստ բարձրացնում են ֆերմենտի ակտիվությունը: Պարախլորմերկուրի րենդոատի կոնցենտրացիայի բարձրացմանը զուգընթաց ֆերմենտի ակտիվության բարձրացում չի նկատվում, ընդհակառակը, ֆերմենտի ակտիվությունը որոշ չափով ճնշվում է, հասնելով նորմային:

Նրկու տարրեր ունակտիվությամբ օժտված թիրուային ռեսպենսները, ֆերմենտի ակտիվ կենսաբանի SH-խմբերը կապում են տարրեր ինտենսիվությամբ: Մոնոյոդրացախաթթուն կապում է ֆերմենտի ավելի ռեակտիվ SH-խմբերը, իսկ պարախլորմերկուրի րենդոատը ինչպես ավելի ռեակտիվ, այնպես էլ թույլ ռեակտիվ խմբերը: Այդ պատճառով էլ այդ ռեակտիվների էքզիվադենս քանակությունները տարբեր SH-խմբերի վրա տարրեր ինտենսիվությամբ են ազդում: Ստացված տվյալները թույլ են տալիս հզրակացնելու, որ հիմնային ֆոսֆատազայի ակտիվությունը ճնշող SH-խմբերը, իրենց ունակտիվությամբ լինում են երկուսից ավելի ակտիվ:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Адунц Г. Т., Абрамова Р. А., Асланиян И. Г. и Саркисян Л. В. I Всесоюзный биохимический съезд. Тезисы докладов. Январь, Ленинград, 1964.
2. Адунц Г. Т. и Саркисян Л. В. Вопросы биохимии. изд. АН АрмССР, Ереван, т. 3, стр. 115, 1963.
3. Адунц Г. Т. и Абрамова Р. А. Вопросы биохимии, изд. АН АрмССР, т. 3, стр. 125, 1963.

4. Вилле Б. Л. В кн. Труды V международного биох. конгресса, IV Симпозиум, изд. АН СССР, стр. 192, М., 1962.
5. Вильямс Р. Дж. П. В кн. Труды V международного биох. конгресса, IV Симпозиум, изд. АН СССР, стр. 160, М., 1962.
6. Горкин В. Э. Ферменты, под ред. Браунштейна, изд. Наука, стр. 192, М., 1961.
7. Диксон М. и Уэбб Э. Ферменты, изд. ИЛ, стр. 164, М., 1961.
8. Торчинский Ю. М. В кн.: Ферменты, изд. Наука, стр. 121, 1961.
9. Boyer D. P. The Enzymes v. 1, N. J. London. Acad. press p. 511, 1959.
10. Lowry O. H. and Lopez J. A. J. Biol. Chem., 143, 257, 1952.
11. Mathies J. C., J. Biol. Chem., 233, 5, 1121, 1958.
12. Rogers K. S., Thomson T. E. and Hellerman L., Biochem. Biophys. acta 64, 202, 1962.