

Г. К. ПАРСАДАНЯН

О НЕКОТОРЫХ СВОЙСТВАХ ФОСФОПРОТЕИДФОСФАТАЗЫ

Фосфопротеидфосфатаза (ФПФ-аза)—фермент, отщепляющий фосфатную группу от сериновых остатков молекулы фосфопротеинов—была открыта Харрисом в 1946 г. [4]. Начиная с этого времени, интенсивное исследование этого фермента шло по нескольким направлениям. Изучались активаторы и ингибиторы тканевой ФПФ-азы, исследовалась субстратная специфичность энзима, были сделаны определенные попытки выяснить механизм его действия. Предприняты первые шаги к частичной очистке и выделению ФПФ-азы.

Наиболее распространенным объектом для изучения свойств ФПФ-азы до последнего времени были селезенка и печень различных млекопитающих. Несмотря на высокую активность, фермент, полученный из этих органов, обладал низкой специфичностью, отщепляя фосфор помимо фосфопротеинов также и от ряда других фосфорсодержащих соединений [5, 7].

Роузом [8] было установлено, что в ряде других органов и тканей имеется ФПФ-аза, отличающаяся по уровню стабильности, специфичности, действию некоторых активаторов и ингибиторов от ФПФ-азы селезенки и печени. По-видимому, ФПФ-аза представлена в организме животных в виде двух или нескольких изоэнзимов. Одним из важных тестов, могущих разрешить этот вопрос, является воздействие реагентов, блокирующих SH-группы, на ФПФ-азу различных тканей и органов (тем более, что известно об ингибирующем эффекте ряда тиоловых реагентов на ФПФ-азу селезенки и печени). Помимо тканевой гетерогенности, установлено, что ФПФ-азы из различных субклеточных образований одной и той же ткани не являются также идентичными ферментами, так как отличаются по реакции на молибдат аммония [6]. Наши недавние исследования [2] ФПФ-азы позволили предположить, что по ряду своих особенностей ФПФ-аза сердца приближается к описанной Роузом [8] ФПФ-азе мозга, почек, красных кровяных телец, но не к ФПФ-азе селезенки и печени.

Целью настоящей работы было изучение влияния тиоловых ядов на активность ФПФ-азы селезенки, печени, почек и сердца. Объектом исследования была ФПФ-аза указанных тканей белых крыс. Ткань гомогенизировали в блендоре типа Уорринга в течение 5 мин. на холоду. Активность фермента ФПФ-азы (КФ 3.1.3.16) определяли методом Файнштейна и Фолька [3] с некоторыми изменениями. В качестве субстрата использовали казеин. SH-блокирующими агентами в наших опытах служили моноиодуксусная кислота и пара-хлормеркурибензоат

(п-ХМБ). Реакционная смесь содержала 1 мл гомогената ткани, 5 мл 1%-ного раствора казеина и 1 мл соответствующего раствора SH-блокирующего агента (в конечной концентрации от 10^{-5} до 10^{-2} М). Раствор казеина и гомогенат ткани были приготовлены на боратном буфере рН 6,0.

После одночасовой инкубации при 37°C ферментативная реакция останавливалась 3 мл 30%-ной трихлоруксусной кислоты. Активность фермента выражали в мкг отщепившегося фосфора казеина на 1 г ткани в 1 час. Приведенные данные — это средние 5—6 опытов, статистически они достоверны.

Как известно, SH-группы белков проявляют различную реакционную способность. В белках условно различают три типа сульфгидрильных групп: 1) легко реагирующие, лабильные, 2) вяло реагирующие и 3) «замаскированные». Иодацетат относится к числу тех тиоловых реагентов, которые взаимодействуют с наиболее лабильными и активными SH-группами белков.

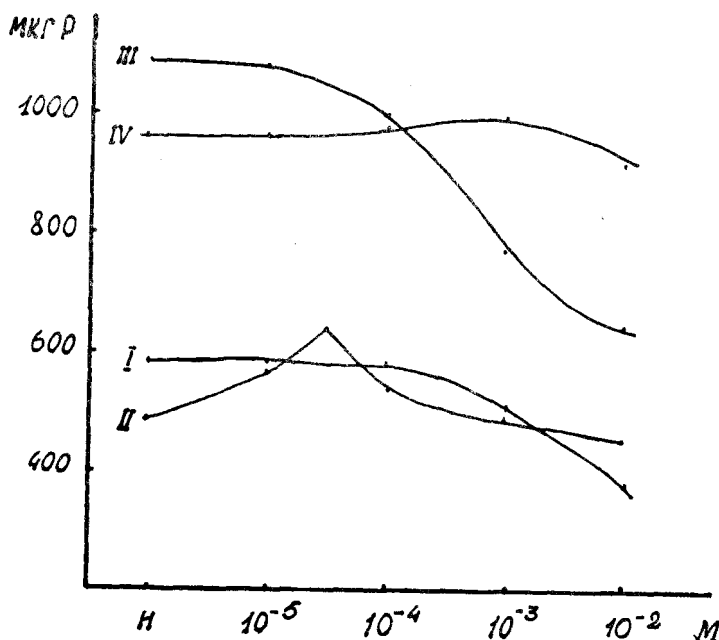


Рис. 1. Влияние моноиодацетата на активность ФПФ-азы гомогенатов тканей белых крыс. По вертикали: активность фермента в мкг неорг. Р/г ткани/час. По горизонтали: концентрация моноиодацетата в М. I — печень, II — сердце, III — селезенка, IV — почки.

Как видно из рис. 1, концентрация иодацетата 10^{-5} М практически не влияла на активность ФПФ-азы селезенки. Но уже 10^{-4} М этого реагента приводит к потере активности на 8% по сравнению с нормой, а повышение концентрации иодацетата в реакционной среде до 10^{-3} и 10^{-2} М является причиной снижения активности фермента соответ-

ственно на 30 и 43%. Примерно такая же картина наблюдается и при исследовании ФПФ-азы печени. В этом случае присутствие иодацетата в концентрациях 10^{-5} и 10^{-4} М не влияет на активность фермента. Понижение активности ФПФ-азы наблюдается уже при наличии в среде 10^{-3} М иодацетата. При концентрации 10^{-2} М ФПФ-азная активность падает до 65% против нормы.

Совершенно иной эффект оказывает иодоуксусная кислота на активность ФПФ-азы сердца. Сильно разбавленный раствор иодацетата (10^{-5} М) повышает активность фермента на 15%. Наибольший эффект достигается при концентрации иодацетата $5 \cdot 10^{-5}$ М (632 мкг Р/г ткани против 479 в норме). Активирующее действие иодацетата остается и при повышении его концентрации до 10^{-3} М, лишь при 10^{-2} М энзиматическая активность по отношению к норме незначительно снижается. Что касается ФПФ-азы почек, то иодацетат, по-видимому, не вызывает существенного изменения активности этого фермента. Так, отмечается лишь повышение активности на 3% при 10^{-3} М и снижение на 7% при 10^{-2} М. Таким образом, приведенные на рис. 1 данные подтверждают мнение о гетерогенности ФПФ-азы в различных тканях и органах [2, 8].

В следующей серии опытов было изучено влияние возрастающих концентраций п-ХМБ на активность ФПФ-азы в ряде органов. Известно, что п-ХМБ является гораздо более жестким тиоловым реагентом, чем моноиодоуксусная кислота, и может связывать даже вяло реагирующие SH-группы белка. Поэтому даже в небольших концентрациях данный реагент во всех изученных органах приводит к значительному подавлению активности ФПФ-азы (рис. 2). Уменьшение активности фермента селезенки на 20% уже при концентрации п-ХМБ 10^{-4} М с возрастанием концентрации этого тиолового реагента становится все более явным и, наконец, под действием 10^{-2} М п-ХМБ доходит до 18% от начальной активности.

В печени ФПФ-аза изменяется подобным же образом. Если при концентрации 10^{-4} М активность фермента снижена до 80% по сравнению с нормой, то 10^{-2} М п-ХМБ доводит активность уже до 18%. Дальнейшее повышение концентрации п-ХМБ в реакционной среде приводит к полному исчезновению активности ФПФ-азы. В сердечной мышце п-ХМБ вызывает такие же изменения в активности фермента, как в селезенке и печени. При концентрации 10^{-3} М активность падает до 427 мкг Р/г ткани (норма—510 мкг Р/г ткани). Этот спад усиливается, когда в инкубационной смеси мы используем п-ХМБ в концентрации 10^{-1} М. Активность фермента в этом случае едва достигает 32% нормы. При концентрации п-ХМБ 10^{-1} М и 10^{-2} М активность ФПФ-азы сердца почти полностью подавлена (соответственно 11 и 9% от начальной активности).

По отношению к п-ХМБ, как и к иодацетату, наиболее устойчивой оказалась ФПФ-аза почек. Уменьшение активности фермента с повы-

шением концентрации п-ХМБ носило здесь почти линейный характер: с повышением концентрации фермента на один порядок наблюдалось падение активности фермента в среднем всего на 10%. Таким образом, активность ФПФ-азы почек при концентрации п-ХМБ в 10^{-2} М составляла 532 мкг Р/г ткани, что соответствовало 57% активности фермента в норме.

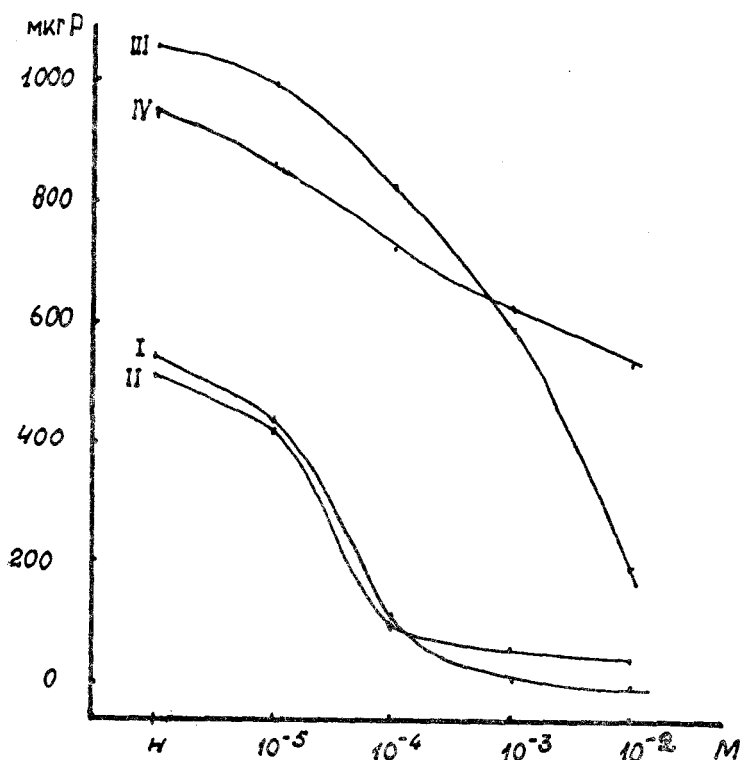


Рис. 2. Влияние п-ХМБ на активность ФПФ-азы гомогенатов тканей белых крыс. По вертикали: активность фермента в мкг неорг. Р/г ткани/час. По горизонтали: концентрация п-ХМБ в М. I — печень, II — сердце, III селезенка, IV — почки.

Таким образом, моноиодацетат снижал активность ФПФ-азы печени и селезенки. По-видимому, в этом случае связываются наиболее реактивные SH-группы, расположенные в активном центре фермента и выполняющие каталитическую функцию. Интересное явление наблюдается с ФПФ-азой сердца. Иодацетат в концентрациях 10^{-5} — 10^{-3} М повышает активность фермента. По этому признаку ФПФ-аза сердца отличается от фермента селезенки и печени, относящегося к тиоловым ферментам. В сердечной мышце определенная часть активных центров ФПФ-азы в обычных условиях блокируется неидентифицированным сульфгидрильным соединением (возможно, регулятором ФПФ-азной активности). Эти данные об активирующем действии иодацетата на ФПФ-азу сердца крыс нашли подтверждение в наших предварительных опы-

тах по ФПФ-азе сердца кроликов и морских свинок. О возможности подобного рода активации ферментов свидетельствуют результаты работ Адунца [1] по щелочной фосфатазе почек и слизистой оболочки тонкого кишечника. Однако для окончательного утверждения о репрессорном действии SH-групп на ФПФ-азу сердца нужен еще ряд дополнительных исследований, в частности по влиянию цистеина и других сульфгидрильных соединений на этот фермент.

Кривые, отражающие влияние другого тиолового реагента—п-ХМБ—на активность ФПФ-азы, показывают резкое подавление ферментативной активности во всех рассматриваемых органах. Различный ход кривых торможения активности в присутствии иодацетата и п-ХМБ обусловлен, по-видимому, различиями в величине и заряде ионов ингибиторов. Необходимо учесть, что п-ХМБ влияет как на лабильные SH-группы, выполняющие непосредственно каталитические функции, так и на SH-группы, участвующие в поддержании третичной структуры молекулы фермента. Благодаря этому, вероятно, активность ФПФ-азы сердца в конечном итоге и оказывается пониженной при добавлении в реакционную смесь указанных концентраций п-ХМБ.

Приведенные данные позволяют судить о том, что ФПФ-аза в различных органах и тканях одного и того же животного не является гомогенным ферментом, что, в частности, проявляется в ее отношении к различным ингибиторам SH-групп и представлена в виде двух или нескольких изоэнзимов.

В ы в о д ы

1. С повышением в реакционной среде концентрации моноиодуксусной кислоты (от 10^{-5} М до 10^{-2} М) наблюдается заметное падение активности ФПФ-азы селезенки и печени крыс. ФПФ-аза почек оказалась практически индифферентной к этому реагенту, а на ФПФ-азу сердца моноиодуксусная кислота в концентрации $5 \cdot 10^{-5}$ М оказывает противоположный эффект, повышая ее активность на 43%.

2. п-ХМБ подавляет активность ФПФ-азы во всех указанных органах. При концентрации этого реагента в 10^{-2} М активность ФПФ-азы сердца и печени падает до нуля. Резко подавляется и активность ФПФ-азы почек и селезенки.

Разнородный характер кривых, показывающих влияние возрастающих концентраций указанных двух сульфгидрильных реагентов на ФПФ-азу различных тканей, свидетельствует о наличии тканевой гетерогенности ФПФ-азы.

2. 4. ՓԱՐՍԱԴԱՆՅԱՆ

ՖՈՍՖՈՊՐՈՏԵԻՆՖՈՍՖԱՏԱԶԱՅԻ ՄԻ ՔԱՆԻ ԱՌԱՆՁՆԱՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ՄԱՍԻՆ

Ա մ փ ո փ ու լ մ

Հոդվածում ուսումնասիրվել է թիրուլային թուլյների ազդեցությունը սպիտակ առնետների փայծաղի, լյարդի, երիկամների և սրտի համոգենատներում ֆոսֆոպրոտեինֆոսֆատազայի (ՖՊՖ-ազայի) ակտիվության վրա: Պարզվել է, որ ռեակցիոն միջավայրում մոնոյոդ քացախաթթվի կոնցենտրացիայի բարձրացմանը զուգընթաց (10^{-5} — 10^{-2} M) նկատելիորեն ընկճվում է լյարդի և փայծաղի ՖՊՖ-ազային ակտիվությունը: Երիկամի ՖՊՖ-ազան զգալի փոփոխություններ չի կրում, իսկ դրա հակառակ, սրտի ֆերմենտը նկատելիորեն ակտիվանում է (43%) $5 \cdot 10^{-5}$ M մոնոյոդ քացախաթթվով: Վերը նշված բոլոր հյուսվածքներում պարաբոլո մերկուրի բենզոատն ընկճում է ֆերմենտի ակտիվությունը: Այդ ռեակցիայի 10^{-5} քանակը լրիվ ընկճում է լյարդի և սրտի ՖՊՖ-ազայի ակտիվությունը: Նշված հյուսվածքների ՖՊՖ-ազայի ակտիվության վրա այդ երկու սուլֆհիդրիլային ռեակտիվների աճող կոնցենտրացիաների տարբեր ազդեցությունները վկայում են ֆերմենտի հյուսվածքային սպեցիֆիկության մասին:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Адунц Г. Т. Биол. журнал Армении, XIX, 3, 30, 1966.
2. Парсаданян Г. К. Изв. АН АрмССР (биол. науки), 17, 12, 85, 1964.
3. Finestain R. & Folk M. J. Biol. Chem., 177, 339, 1949.
4. Harris D. J. Biol. Chem. 165, 541, 1946.
5. Hofman, T. Biochem. J. 69, 135, 1958.
6. Paigen C. a. Griffiths S. J. Biol. Chem., 234, 299, 1959.
7. Revel & Racker E. Biochim. Biophys. Acta, 43, 465, 1960.
8. Rose S. P. R. Nature, 199, 375, 1962.