

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ИНГИБИТОРОВ НА АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ ПЕРЕАМИНИРОВАНИЯ РАЗВЕТВЛЕННЫХ АМИНОКИСЛОТ CANDIDA GUILLIERMONDII

И. В. ГОГИНЯН

Показан тиоловый характер трансаминазы разветвленных аминокислот (Ф I) и лейцинспецифичной трансаминазы (Ф II). Действие классических ингибиторов трансаминаз (циклосерина и гидроксилamina) на исследуемые ферменты по характеру отличается от такового на ферменты другого происхождения. Моно- и дикарбоновые кислоты конкурентно ингибируют активность Ф I и Ф II.

В предыдущих наших исследованиях было показано наличие двух ферментных систем переаминирования разветвленных аминокислот (Ф I и Ф II) у дрожжей *C. guilliermondii* ВКМ У-42. Было изучено поведение этих ферментативных активностей при гельфильтрации и ионообменной хроматографии, а также влияние ионной силы среды и низких температур на активность трансаминарования разветвленных аминокислот [4]. На основании выявленных свойств ферментов был разработан метод их очистки и изучены некоторые кинетические свойства (оптимум pH, K_m , молекулярный вес) очищенных ферментных препаратов [5].

В настоящей работе приведены результаты изучения влияния различных ингибиторов на активность Ф I и Ф II с целью более глубокой характеристики последних.

Материал и методика. Выращивание дрожжей и определение ферментативной активности проводились по ранее описанным методам [4]. Ингибиторы добавлялись в инкубационную смесь без предварительной предынкубации с ферментом. Моно- и дикарбоновые кислоты добавлялись в количестве 20 мкМ.

Результаты и обсуждение. В первой серии экспериментов изучалось влияние парахлормеркурийбензоата (ПХМБ), блокирующего SH-группы с образованием меркаптидов, на трансаминазную активность разветвленных аминокислот (Ф I и Ф II).

Как видно из данных табл. I, при низких концентрациях ПХМБ ($0,063 \times 10^{-5}$ М) активность Ф I и Ф II уменьшается незначительно (на 10 и 8% соответственно). При увеличении его концентрации процент ингибирования повышается, причем несколько быстрее у Ф I. Полное ингибирование обоих ферментов достигается при концентрации ПХМБ 5×10^{-5} М.

Следует отметить, что Ф II печени крыс менее чувствителен к действию ПХМБ, так как полное ингибирование его наступает при более высоких концентрациях ингибитора— 1×10^{-3} М [6]. Еще менее чувствительными к действию ПХМБ оказались ферменты переаминирования разветвленных аминокислот бактериального происхождения. Так, фермент, выделенный из *Acetobacter suboxydans*, при концентрации ПХМБ 1×10^{-3} М ингибируется на 51% [4], а из *Neurospora crassa*—на 79% при концентрации 1×10^{-1} М [5].

Таким образом, SH-группы изучаемых нами ферментов (Ф I и Ф II) подобно Ф II печени крысы и трансаминазе разветвленных аминокислот, выделенных из *Acetobacter suboxydans* и *Neurospora crassa*, ответственны за ферментативную активность.

Таблица 1

Влияние различных концентраций ПХМБ на активность Ф I и Ф II

Концентрация ПХМБ, М	% ингибирования	
	Ф I	Ф II
5×10^{-5}	100	100
2×10^{-5}	85	71
$0,5 \times 10^{-5}$	73	61
$0,25 \times 10^{-5}$	61	48
$0,063 \times 10^{-5}$	10	8

Таблица 2

Влияние различных концентраций гидроксилamina на активность Ф I и Ф II

Концентрация гидроксилamina, М	% ингибирования	
	Ф I	Ф II
$2,5 \times 10^{-2}$	100	100
$1,25 \times 10^{-2}$	38	52
$0,625 \times 10^{-2}$	20	35
$0,310 \times 10^{-2}$	11	27

С другой стороны, по другим данным, трансаминаза В, выделенная из *Salmonella typhimurium*, не реагирует ни на р-гидроксимеркурийбензоат, ни на ионы тяжелых металлов, в том числе Hg^{2+} . Авторы заключают, что активность выделенного ими фермента не зависит от наличия сульфгидрильных групп [7].

Из карбонильных реагентов, блокирующих альдегидную группу пиридоксальфосфата, нами испытывался гидроксилamin. Полученные данные (табл. 2) свидетельствуют о большей чувствительности Ф II ко всем испытанным концентрациям ингибитора, по сравнению с Ф I; полное ингибирование обоих ферментов достигается при концентрации гидроксилamina $2,5 \times 10^{-2}$ М.

Приблизительно при той же концентрации циклосерина ($2,8 \times 10^{-2}$ М) наблюдается 100%-ное ингибирование Ф I и Ф II (табл. 3). Однако, в отличие от гидроксилamina, различные концентрации циклосерина примерно одинаково ингибирует активность обоих ферментов, за исключением самой низкой из испытанных— $0,35 \times 10^{-2}$ М, при которой Ф I ингибируется на 43, а Ф II—на 60%.

Следует отметить, что трансаминаза разветвленных аминокислот (Ф I), выделенная из *Acetobacter suboxydans*, ингибируется гидрокси-

ламинои и циклосеринои на 50 и 74% соотвѣтственно при концентрации последних 1×10^{-3} М [4].

Еще более чувствительна к действию гидроксиламина трансаминаза разветвленных аминокислот (Ф I) сердечной мышцы свиньи: при концентрации ингибитора 1×10^{-6} М этот фермент ингибируется на 82% [6].

Исследования, проведенные на животных трансаминазах, показали, что синтетический DL-циклосерин в концентрациях порядка 10^{-4} М действует как мощный ингибитор аланин-трансаминазы печени крыс [3].

Ряд других трансаминаз животного происхождения тормозились при концентрациях на 2—3 порядка более высоких, а аспартат-трансаминаза различного происхождения (печень, сердечная мышца, *Vacillus subtilis*) оказалась весьма резистентной к действию DL-циклосерина.

Таблица 3
Влияние различных концентраций циклосерина на активность Ф I и Ф II

Концентрация циклосерина, М	% ингибирования	
	Ф I	Ф II
$2,8 \times 10^{-2}$	100	100
$1,4 \times 10^{-2}$	75	78
$0,7 \times 10^{-2}$	68	73
$0,35 \times 10^{-2}$	43	60

Таблица 4
Влияние моно- и дикарбоновых кислот на активность Ф I и Ф II

Кислоты	% ингибирования	
	Ф I	Ф II
Муравьиная	17	29
Уксусная	19	39
Пропионовая	22	22
Масляная	25	27
Валериановая	39	25
Капроновая	48	64
Щавелевая	6	32
Малоновая	12	23
Янтарная	37	37
Фумаровая	22	25
Глутаровая	7	30

В следующей серии экспериментов нами испытывалось влияние моно- и дикарбоновых кислот, являющихся аналогами субстратов разветвленных аминокислот, на трансаминазную активность Ф I и Ф II.

Как видно из полученных данных (табл. 4), ингибирующее влияние монокарбоновых кислот на активность Ф I увеличивается с удлинением их углеродной цепочки. Для Ф II такая закономерность не наблюдается. Наибольшая степень ингибирования обоих ферментов достигается в вариантах с капроновой кислотой, причем Ф II более чувствителен к ее действию (64%), чем Ф I (48%).

Дикарбоновые кислоты ингибируют Ф I в значительно меньшей степени, а Ф II—приблизительно в той же степени, что и монокарбоновые. Наиболее сильным ингибитором из дикарбоновых кислот оказалась янтарная кислота.

Степень ингибирования трансаминаз карбоновыми кислотами зависит от pH инкубационной среды. Так, Ф I из сердечной мышцы свиньи сильно ингибируется моно- и дикарбоновыми кислотами при pH 8,3,

а при более высоких его значениях—лишь монокарбоновыми кислотами [11]. Подобные результаты были получены при исследовании торможения активности мозговой трансаминазы ГАМК карбоновыми кислотами в диапазоне рН 7,7—8,6. При сдвиге рН в более кислую сторону ингибирующее действие дикарбоновых кислот (глутаровая, адипиновая и янтарная) заметно усиливается, а монокарбоновых—остается без изменения [2].

Таким образом, примененные ингибиторы трансаминаз, а также ПХМБ оказывают ингибирующее влияние на изоферменты трансаминазы разветвленных аминокислот дрожжей *Candida guilliermondii* ВКМ У-42, по характеру отличающееся от влияния их на некоторые ферменты другого происхождения. При этом раскрываются и существенные различия между изученными двумя изоферментами Ф I и Ф II.

Ереванский государственный университет,
кафедра биохимии и проблемная лаборатория
сравнительной и эволюционной биохимии

Поступило 13.III 1979 г.

ՏԱՐԲԵՐ ԻՆՀԻԲԻՏՈՐՆԵՐԻ ԱԶԳԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ CANDIDA GUILLIERMONDII
ԽՄՐՈՐԱՍՆԿԵՐԻ ՀՅՈՒՂԱՎՈՐՎԱՍ ՍՄԻՆԱԹՅՈՒՆԵՐԻ
ՏՐԱՆՍԱՄԻՆԱԶԱՅԻՆ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՎՐԱ

Ի. Վ. ԳՈԴԻՆՅԱՆ

Ցույց է տրված ճյուղավորված ամինաթթուների տրանսամինազայի (Ф I) և լեյցինին սպեցիֆիկ տրանսամինազայի (Ф II) թրոլային բնույթը:

Տրանսամինազների կլասիկ ինհիբիտորների՝ ցիկլոսերինի և հիդրօքսիլամինի ազդեցությունը հետազոտվող ֆերմենտների վրա իր բնույթով տարբերվում է այլ ֆերմենտների վրա նրանց ունեցած ազդեցությունից: Մոնո- և դիկարբոնաթթուները Ф I և Ф II ենթարկվում են կոնկուրենտային արգելակման:

INFLUENCE OF DIFFERENT INHIBITORS ON THE ACTIVITY OF
BRANCHED CHAIN AMINO ACID TRANSAMINATION ENZYMES
OF CANDIDA GUILLIERMONDII

I. V. GOGINIAN

It was shown, that transaminase of branched chain aminoacids (Ф I) and leucine-specific transaminase (Ф II) were inhibited by typical inhibitors of thiol-enzymes.

The character of action of classic inhibitors (cicloserine and hydroxylamine) of transaminases on the activity of Ф-I and Ф-II is different from effect on other enzymes. Ф-I and Ф-II are competitively inhibited by mono and dicarbonic acids.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Браунштейн А. Е. Докл. на VIII Менделеевском съезде по общей и прикладной химии. Секция химии природных соединений и биохимии, март, 1958.
2. Васильев В. Ю., Автореф. канд. дисс., Л., 1969.
3. Вышепань Е. Д., Иванова К. И., Чернух А. М. Бюлл. экспер. биологии и медицины, 47, 52, 1959.
4. Гогинян И. В., Багдасарян Е. Г., Давтян М. А. Биолог. ж. Армении, 29, 9, 1976.
5. Давтян М. А., Гогинян И. В., Багдасарян Е. Г. Биолог. ж. Армении, 30, 1, 1977.
6. Aki K., Ogawa K., Ichihara A. Biochim., Biophys. Acta, 159, 2, 1968.
7. Coleman M. S., Armstrong F. B. Biochim., Biophys. Acta, 227, 1971.
8. Collins M., Wagner R. Arch. Biochem., Biophys., 155, 184, 1973.
9. Tachiki T., Tochikura T. Agr. a. Biol. Chem. (Japan), 40, 11, 1976.
10. Taylor R., Jenkins T. J. Biol. Chem., 241, 19, 1966.
11. Taylor R., Shakespeare V., Jenkins W. T. J. Biol. Chem., 245, 19, 1970.