

К ВОПРОСУ О РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ

Г. Т. АДУНЦ, Л. В. САРКИСЯН, В. О. БАРСЕГЯН

Изучалось влияние L—фенилаланина, гистидина, тирозина, тироксина и магния на активность очищенной щелочной фосфатазы, выделенной из тонких кишок цыплят. Предполагается, что L—фенилаланин, гистидин и магний связываются с разными аллостерическими и каталитическими центрами щелочной фосфатазы, меняя структуру молекулы белка и, тем самым, изменяя биологическую активность фермента.

Ключевые слова: щелочная фосфатаза, денатурация белков, аллостерический центр.

Активация фермента ионами металлов предполагает образование тройного комплекса фермент-ион металла-субстрат. Существует несколько вариантов организации этого комплекса, и все они встречаются в реальных системах [7, 8, 11]. Примерно одна треть известных ферментов требует для проявления максимальной активности добавления ионов металлов, либо они содержат прочно связанный ион металла, принимающий участие в каталитических процессах [4].

Щелочная фосфатаза, выделенная из ряда источников, принадлежит к металлоэнзимам. А щелочная фосфатаза, выделенная из *Escherichia coli*, — единственный хорошо изученный металлоэнзим из числа переносящих фосфат [5].

Ныне установлено, что щелочная фосфатаза является ферментом, который имеет несколько аллостерических центров регуляции [9]. В этом отношении определенный интерес представляют данные, полученные Фишманом и Грином, которые показали, что фенилаланин оказывает стереоспецифическое действие на активность щелочной фосфатазы: D—фенилаланин повышает активность фермента, а L—фенилаланин, наоборот, подавляет. По мнению авторов, L—фенилаланин является специфическим ингибитором щелочной фосфатазы, однако они в своих экспериментах использовали лишь одну концентрацию L—фенилаланина ($5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$) [4].

В настоящем сообщении мы задались целью изучить влияние различных концентраций L—фенилаланина, гистидина, тирозина, тироксина, а также магния на активность щелочной фосфатазы и действие L—фенилаланина на частично денатурированный фермент.

Материал и методика. Опыты ставили на очищенной щелочной фосфатазе фирмы «Reanal» (Венгрия), выделенной из тонких кишок цыплят. В качестве субстрата ис-

пользовали пара-нитрофенилфосфат («Reanal») в концентрации $5 \cdot 10^{-4}$ М в медианальном буфере (рН 9,6). Активность фермента определяли по количеству освободившегося пара-нитрофенола за 10 мин инкубации при температуре 30° . Колориметрировали при длине волны 420 нм. В некоторых опытах фермент предварительно подвергали температурной обработке при $45, 50, 55, 60, 65^\circ$ в течение 10 мин [1].

Результаты и обсуждение. Термоденатурация белков— это одна из характерных свойств биомолекулы. Денатурация белков—это кооперативный процесс, в котором существенную роль играет разворачивание полипептидных цепей, что приводит к нарушению нативных взаимодействий четвертичной и третичной структур белковой молекулы. Эта проблема имеет не только большое теоретическое значение для выявления конформационных изменений молекулы белка, но и практическое— для химической технологии в медицине и в производстве биоактивных веществ [2].

Прежде чем испытать действие вышеуказанных реагентов на активность щелочной фосфатазы, нами была изучена динамика активности ее при умеренной термоденатурации. Оказалось, что активность щелочной фосфатазы при $45, 50^\circ$ -ной термообработке не подвергается денатурации, т. е. фермент сохраняет каталитическую активность. Даже в этих условиях наблюдается некоторое повышение ферментативной активности (рис. 1), однако с повышением температуры ($55, 60^\circ$) активность фермента уменьшается, а при 65° она полностью теряет свою биологическую функцию.

Анализируя данные рис. 1, установили, что имеется нелинейность ингибирования активности фермента, зависящая от температуры, объясняемая двояким состоянием фермента, т. е. превращением его из тетрамерной формы в димерную [10].

Различные концентрации L—фенилаланина по-разному влияют на активность щелочной фосфатазы. L—фенилаланин в концентрации 10^{-2}

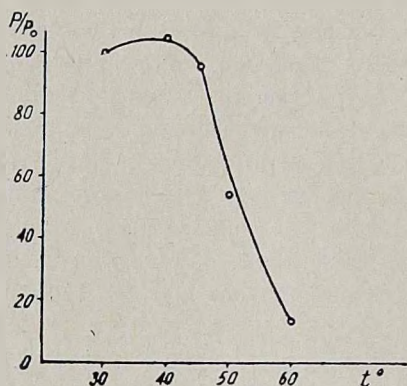


Рис. 1.

Рис. 1. Активность щелочной фосфатазы при разных температурных воздействиях.

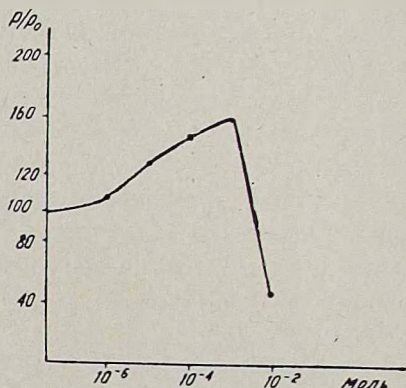


Рис. 2.

Рис. 2. Действие L—фенилаланина на активность щелочной фосфатазы.

$5 \cdot 10^{-3} \text{M}$ подавляет ферментативную активность почти наполовину от первоначальной. Эти наши данные совпадают с данными Фишмана и Грина [6]. Однако максимальная активация фермента отмечается при действии L—фенилаланина в концентрациях 10^{-3} и 10^{-4}M . При дальнейшем уменьшении его концентрации активность достигает уровня нормы (рис. 2).

На фоне умеренной термоденатурации добавление L—фенилаланина в различных концентрациях (10^{-3} , 10^{-2}M) показало, что при 40, 45, 50, 55° термообработке, при котором фермент не теряет каталитической функции, концентрация 10^{-3}M увеличивает его активность на 80%, при повышении температуры (60 , 65°) активность фермента резко снижается, т. е. кривая имеет форму параболы. При концентрации 10^{-2}M L—фенилаланина кривая имеет гиперболическую форму: с увеличением температуры денатурированный фермент теряет свою активность (рис. 3). По-видимому, различные концентрации L—фенилалани-

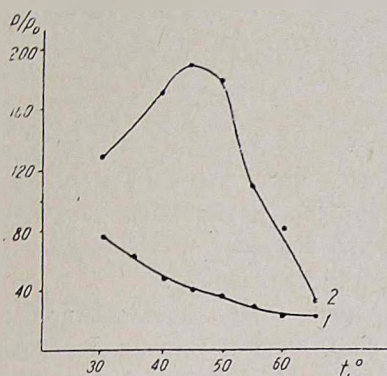


Рис. 3.

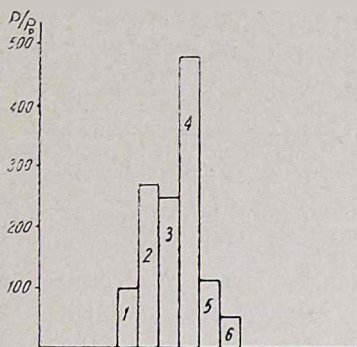


Рис. 4.

Рис. 3. Действие L—фенилаланина на активность щелочной фосфатазы после термообработки.

Рис. 4. Действие магния и L—фенилаланина на активность щелочной фосфатазы. 1— норма, 2— магний 10^{-3}M , 3—L—фенилаланин 10^{-3}M , 4—магний 10^{-3}M +L—фенилаланин 10^{-3}M , 5— магний 10^{-3}M +L—фенилаланин 10^{-2}M , 6— L—фенилаланин 10^{-2}M .

на соединяются с разными аллостерическими центрами, поэтому в одном случае замечается увеличение активности, в другом,— наоборот, уменьшение.

Как было отмечено выше, L—фенилаланин в концентрации 10^{-3}M значительно повышает ферментативную активность (270%), одновременно известно, что магний достаточно хорошо активирует этот фермент в концентрации 10^{-3}M (280%). Сочетание обоих реагентов в указанных концентрациях показало суммирование эффектов активации (480%). Отсюда следует, что приведенные концентрации магния и L—фенилаланина соединяются с разными участками фермента, создавая благоприятные условия для каталитической функции (рис. 4).

Как известно из литературных данных, цинк соединяется с гистидином, образуя три лиганда, которые ответственны за осуществление ферментативной реакции. Файт и Вале [3], фотоокисляя гистидин, показали, что фермент не способен соединяться с субстратом. Поэтому интересно было проследить за динамикой активности щелочной фосфатазы под действием гистидина в разных концентрациях. Было показано, что гистидин в концентрации 10^{-2} М подавляет активность фермента на 50 %, начиная с концентрации $5 \cdot 10^{-3}$ М отмечается повышение ферментативной активности, однако с уменьшением концентраций ($5 \cdot 10^{-5}$, 10^{-5} , $5 \cdot 10^{-6}$ М) повышающий эффект ослабевает (рис. 5).

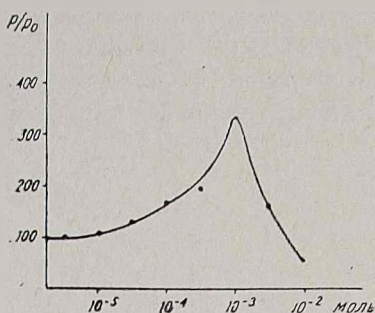


Рис. 5. Действие гистидина на активность щелочной фосфатазы.

Было изучено также влияние тирозина и тироксина на активность исследуемого фермента и показано, что эти реагенты в разных концентрациях особых сдвигов в активности не производят.

Суммируя вышеприведенные данные, можно сделать предположение о связывании L-фенилаланина, гистидина и магния с разными аллостерическими и каталитическими центрами фермента и изменении структуры молекулы белка, вследствие чего фермент изменяет свою биологическую активность.

Институт биохимии

АН Армянской ССР

Поступило 14. III. 1980 г.

ՀԻՄՆԱՅԻՆ ՖՈՍՖԱՏԱԶԱՅԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ԿԱՐԳԱՎՈՐՄԱՆ ՀԱՐՑԻ ՄԱՍԻՆ

Գ. Թ. ԱՂՈՒՆՑ, Լ. Վ. ՍԱՐԳՍՅԱՆ, Վ. Հ. ԲԱՐՍԵՂՅԱՆ

Ուսումնասիրվել է L-ֆենիլալանինի, հիստիդինի, տիրոզինի, թիրոքսինի և մագնեզիումի ազդեցությունը ճտերի բարակ աղիներից անջատված հիմնային ֆոսֆատազայի ակտիվության վրա:

Ենթադրվում է, որ L-ֆենիլալանինը, հիստիդինը և մագնեզիումը կապվում են հիմնային ֆոսֆատազայի տարբեր ալոստերիկ և կատալիտիկ կենտրոնների հետ, փոխելով սպիտակուցի մոլեկուլի կառուցվածքը, ֆերմենտի բիոլոգիական ակտիվությունը:

ON THE REGULATION OF ALKALINE PHOSPHATASE ACTIVITY

G. T. ADUNTZ, L. V. SARKISSIAN, V. O. BARSEGIAN

The effect of L-phenylalanine, histidine, tyrosine, tyroxin and magnesium ions on the activity of alkaline phosphatase from chicken thin intestine has been studied. Data obtained indicate that L-phenylalanine, histidine and magnesium ions bound at different catalytic and allosteric centers of alkaline phosphatase alter conformation of protein molecule and thus change its biological activity.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Барсегян В. О., Саркисян Л. В., Адунц Г. Т. Биолог. ж. Армении, 31, 6, 606, 1978.
2. Мартинек К., Можяев В. В., Березин И. В. Докл. АН СССР, 239, 2, 483, 1978.
3. Fait G. H., Vallee B. L. Proc. Natn. Acad. Sci., U.S.A., 56, 1247, 1966.
4. Flshman W. H., Green S., Inglis N. I. Nature, 198, 481, 685, 1963.
5. Hanson A. W., Applebury M. L., Coleman I. E., Wyckoff H. W., Richards F. M. J. Biol. Chem., 245, 4975, 1970.
6. Lehninger A. L. Physiol. Rev., 30, 393, 1950.
7. Melchior I. B. Biochemistry, 4, 1518, 1965.
8. Mildvan A. S., in P. D. Boyer (ed.), The Enzymes 3rd end., 1, Academic Press, New York, 1970.
9. Reid T. W., Wilson L. B. in P. D. Doyer (ed.), The Enzymes 3rd end., 4, Academic, Press, New York, 373, 1974.
10. Reunolds J. A., Schlesinger M. J. Biochemistry, 8, 4287, 1969.
11. Reynard A. M., Haas L. F., Jacobson D. O., Boyer P. D. J. Biol. Chem. 236, 2277, 1961.