

РЕГУЛИРУЮЩЕЕ ВЛИЯНИЕ НЕКОТОРЫХ АМИНОКИСЛОТ НА АКТИВНОСТЬ ФОСФОМОНОЭСТЕРАЗ ПОД ДЕЙСТВИЕМ УЛЬТРАЗВУКА

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

Изучали действие ультразвука на аминокислоты, обуславливающие определенные изменения в каталитической активности щелочной фосфатазы. Показано, что цистеин, гистидин и образовавшиеся при озвучивании продукты связываются с цинком, но не с L-фенилаланином, так как его ингибирование связано не с активным, а с аллостерическим центром изучаемого фермента.

Ключевые слова: щелочная фосфатаза, аминокислоты, ультразвук.

Вопросами изучения регуляции фосфомоноэстераз занимались многие исследователи [6, 12, 9].

В активных центрах фосфатаз обнаружены остатки серина и гистидина [13], их типичными представителями являются кислая (КФ 3.1.3.2.) и щелочная фосфатаза (КФ 3.1.3.1). В неспецифических фосфатазах при образовании промежуточного продукта осуществляется фосфорилирование фермента по серину с участием гистидина; для щелочной фосфатазы необходимы соответствующие количества ионов двухвалентных металлов в качестве кофакторов для компенсации зарядов на фосфатной группировке и облегчения нуклеофильной атаки гидроксильной группы серина на фосфор [8, 10].

Известно, что некоторые аминокислоты, в частности фенилаланин и реагенты, специфичные по отношению к аминок группам (или имидазольным и фенольным группам), способны ингибировать активность щелочной фосфатазы [2, 7, 11].

Ранее нами было показано, что озвучивание фосфатаз приводит к сдвигам в их активности [2].

На основании этих данных и результатов наших предыдущих исследований была поставлена задача изучить действие ультразвука на аминокислоты, обуславливающие определенные изменения в каталитической активности щелочной фосфатазы.

Материал и методика. Опыты ставили на очищенной щелочной и кислой фосфатазах фирмы «Reanal» (ВНР), выделенных из кишок цыплят. Субстратом служили п-нитрофенилфосфат (оптимум pH для щелочной фосфатазы—10,5, кислой—4,95) в концентрации $5 \cdot 10^{-4}$ М в аммиачном и цитратном буферах.

Активность щелочной фосфатазы регистрировали на собранной нами установке, дающей возможность регистрировать кинетику ферментативной реакции. Об актив-

ности фермента судили по нарастанию количества п-нитрофенола в течение реакции (до 5 мин). Интенсивность окраски фотометрировали при длине волны 420 нм [5].

Активность кислой фосфатазы определяли также фотометрически (после инкубации для выявления окраски фенола инкубационную среду подщелачивали КОН до pH 10,5).

Активность очищенной лактатдегидрогеназы из мышц свиньи (производства «Реа-пай», в виде суспензии) определяли методом Кочетова [4]. В качестве действующего физического фактора использовали ультразвук интенсивностью 5 Вт/см², частотой 880 кГц. Озвучивание проводили в течение 5, 10, 15, 20, 25, 30 мин в специальной термостатированной кювете при температуре 25°.

Результаты и обсуждение. Ранее было показано, что высокие концентрации цинка подавляют активность щелочной фосфатазы, тогда как малые активируют ее [1]. Из рис. 1 видно, что цинк в концентрации $5 \cdot 10^{-4}$ М подавляет активность фермента, но при добавлении озву-

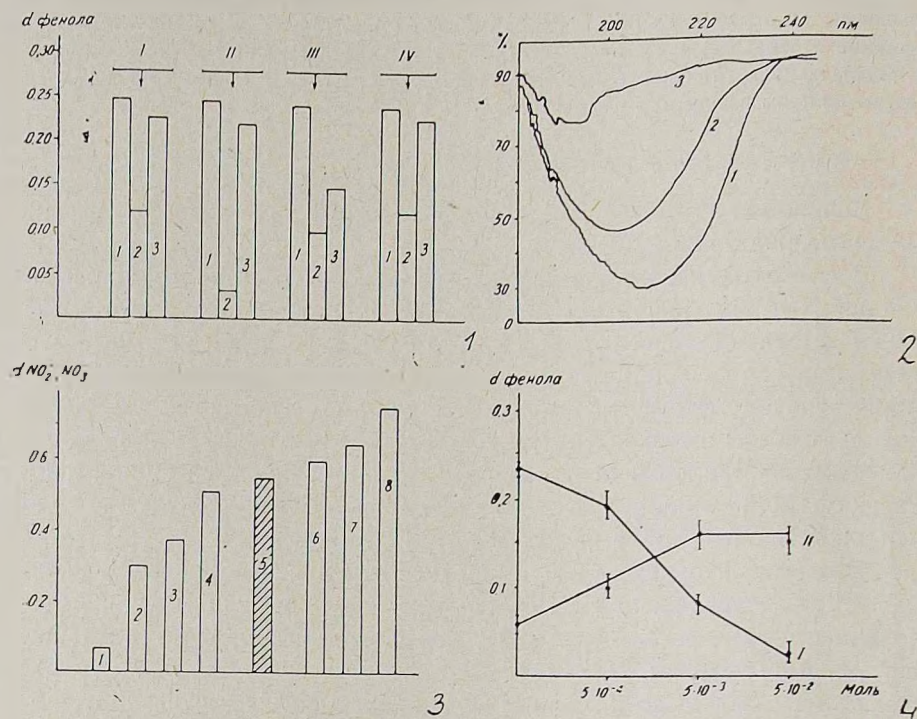


Рис. 1. Изменение активности щелочной фосфатазы после действия ультразвука на цинк и аминокислоты. I—цинк, II—цистеин, III—L-фенилаланин, IV—гистидин. 1—без ингибитора, 2—с ингибитором, 3—с озвученным ингибитором.

Рис. 2. Спектр пропускания озвученной воды в атмосфере и при насыщении кислородом. 1—10-минутное озвучивание на 6 Вт/см², 2—10-минутное озвучивание на 6 Вт/см², при насыщении кислородом.

Рис. 3. Изменение концентраций NO_2^- , NO_3^- в зависимости от растворенных веществ в акустической среде. 1— O_2 ; 2— $ZnCl_2$, $5 \cdot 10^{-3}$ М; 3—щелочная фосфатаза, $5 \cdot 10^{-7}$ М; 4—цистеин $5 \cdot 10^{-3}$ М; 5—озвученная вода (норма); 6—L-фенилаланин, $5 \cdot 10^{-3}$ М; 7—тирозин, $5 \cdot 10^{-3}$ М; 8—гистидин, $5 \cdot 10^{-3}$ М.

Рис. 4. Действие ультразвука на активность щелочной фосфатазы, ингибированной цистеином в разных концентрациях. I—цистеин, II—ультразвук + цистеин.

ченного цинка в той же концентрации этот эффект почти не наблюдается. По всей вероятности, присутствие цинка в озвученной воде способствует (рис. 2) связыванию его с продуктами распада воды (NO_2^- , NO_3^-), что приводит к снижению количества указанных ионов в исследуемом растворе (рис. 3).

Так как, согласно вышеприведенным данным, ультразвук действует на цинк активного центра изучаемого фермента, наши дальнейшие исследования было целесообразно проводить с применением цистеина в качестве органического ингибитора [1]. Оказалось, что фермент, предварительно ингибированный цистеином, после 30 мин озвучивания восстанавливает часть своей активности (рис. 4). Этим экспериментом было показано, что ультразвук действует именно на цинк активного центра щелочной фосфатазы. Высокие концентрации цинка приводят к восстановлению активности ингибированного цистеином и ультразвуком фермента (рис. 5). Озвученный цистеин теряет свое ингибирующее свойство на 50% (рис. 1).

Для выявления специфического действия ультразвука изучали также его влияние на активность кислой фосфатазы и лактатдегидрогеназы в связи с наличием в озвученной среде растворенных газов. Различия в активных центрах и структурах этих ферментов являются причиной расхождения в характере ответных реакций на действие ультразвуковых волн. Так, через 30 сек после озвучивания в атмосферных условиях обнаруживается полная утрата каталитической активности лактатдегидрогеназы, а через 30 мин—щелочной фосфатазы, в то время как активность кислой фосфатазы почти не подвергается ингибированию (рис. 6, 7).

При насыщении среды кислородом с освобождением свободного растворимого азота наблюдается обратная картина: после 5-минутного озвучивания активность кислой фосфатазы полностью ингибируется, а щелочной фосфатазы и лактатдегидрогеназы не изменяется.

Фишманом и Грином было показано, что L-фенилаланин в концентрации $5 \cdot 10^{-3}$ М является ингибитором щелочной фосфатазы [11]. Полученные нами результаты, касающиеся его влияния на активность фермента, совпадают с литературными данными. Оказалось также, что при озвучивании этой аминокислоты происходит незначительное уменьшение эффекта ингибирования, количество NO_2^- , NO_3^- в озвученной воде в ее присутствии не меняется (рис. 1, 3). Несмотря на эти незначительные сдвиги, спектр пропускания L-фенилаланина в широком диапазоне частот резко увеличивается с уменьшением пика (рис. 8). В случае насыщения среды кислородом отмечается сравнительно небольшое изменение спектра пропускания.

Близкий по своему строению к L-фенилаланину, тирозин не вносит определенных изменений в активность щелочной фосфатазы. При его озвучивании наблюдается некоторое увеличение количества NO_2^- , NO_3^- (рис. 3), с резким изменением спектра пропускания в большом диапазоне частот (рис. 9). Наряду с этим, отмечается эффект затухания флуорес-

ценции тирозина на 30%. Подщелачивание среды сопровождается увеличением спектра пропускания тирозина, обнаруживающего сходство с таковым озвученного тирозина, рН которого находится в кислой зоне. При насыщении среды кислородом изменение спектра пропускания при

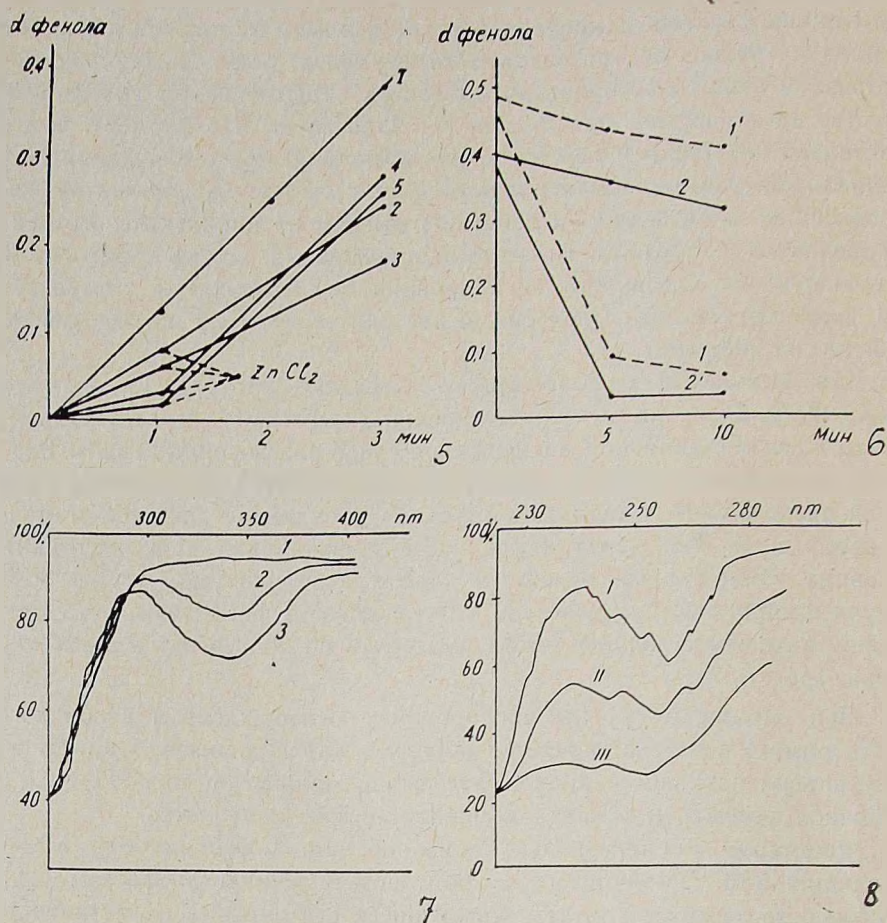


Рис. 5. Действие цинка на активность щелочной фосфатазы, ингибированной аминокислотами и ультразвуком. 1—норма, 2—гистидин, 3—L-фенилаланин, 4—цистеин, 5—ультразвук.

Рис. 6. Действие ультразвука на активность щелочной и кислой фосфатаз в атмосфере и при насыщении кислородом. 1, 1'—щелочная фосфатаза в атмосфере и при насыщении кислородом, 2, 2'—кислая фосфатаза в атмосфере и при насыщении кислородом.

Рис. 7. Действие ультразвука на активность лактатдегидрогеназы в атмосфере и при насыщении кислородом.

Рис. 8. Изменение спектра пропускания L-фенилаланина под действием ультразвука. I—норма, II—при насыщении кислородом, III—в атмосфере.

тех же экспозициях ультразвука уменьшается. После 20-минутного озвучивания в атмосфере (рН 5) тирозин бесцветен, а в щелочной среде (рН 8—10) приобретает желтую окраску, что свидетельствует об образова-

нии нитротирозина. В свободной от азота среде нитротирозин не обнаруживается.

Известно, что гистидин, входящий в активный центр щелочной фосфатазы, играет главенствующую роль в процессах фосфорилирования [13]. В связи с этим представляло интерес проследить за его действием в концентрации 10^{-2} М, при котором отмечалось 50-процентное ингиби-

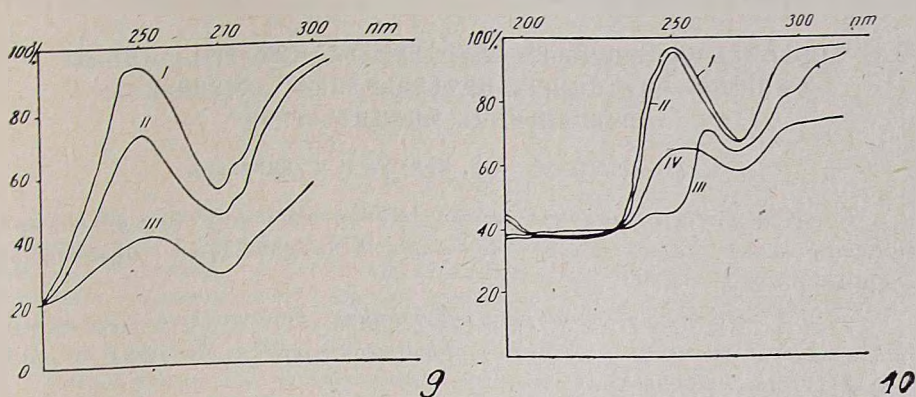


Рис. 9. Изменение спектра пропускания тирозина под действием ультразвука. I—норма, II—при насыщении кислородом, III—в атмосфере.

Рис. 10. Изменение спектра пропускания тирозина в зависимости от pH среды при озвучивании. 1, 2, 3—норма (pH 6, pH 2,5, pH 9), 4—при озвучивании (pH 5).

рование ферментативной реакции. Примечательно, что ингибирование озвученного гистидина с ферментом не приводило к снижению активности последнего. Интересно также, что цинк в концентрации $5 \cdot 10^{-4}$ М не снимает ингибирующего действия гистидина (рис. 5), в то время как последний полностью блокирует подавляющее действие цинка.

Ранее было показано блокирующее действие ультразвука на цинк активного центра щелочной фосфатазы с последующим ингибированием активности фермента [3]. Учитывая эти данные, была предпринята попытка установить характер действия ряда аминокислот и ультразвука на энзиматическую активность. Наблюдения позволили установить защитное действие цинка на ингибирующий эффект цистеина и ультразвука. Вместе с тем цинк не снимает ингибирующее действие гистидина и L-фенилаланина. При торможении активности фермента цинком его действие снимается гистидином, цистеином и ультразвуком, но не L-фенилаланином. Полученные результаты достаточно убедительно подтверждают, что цистеин и продукты, образующиеся при озвучивании, связываются с цинком активного центра. Как уже отмечалось выше, цинк не снимает ингибирующее действие гистидина и L-фенилаланина. По всей вероятности, ингибирование последнего связано не с активным, а аллостерическим центром.

Присутствие гистидина в озвученной среде приводит к резкому увеличению концентраций NO_2^- , NO_3^- , цинка—к развитию противополож-

го сдвига, а L—фенилаланина—к почти незаметным изменениям в концентрации этих ионов.

Резкие колебания концентраций NO_2^- , NO_3^- в среде в зависимости от растворенного в ней вещества, по-видимому, можно связать со спецификой протекающих там окислительно-восстановительных процессов.

Институт биохимии АН Армянской ССР

Поступило 14.III 1980 г.

**ՖՈՍՖՈՐՈՆՈԷՍՏԵՐԱԶՆԵՐԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՎՐԱ ՈՐՈՇ ԱՄԻՆԱ-
ԹՐՈՒՆԵՐԻ ԿԱՐԻԱՎՈՐԻՉ ԱԶԳԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ՈՒՆՏՐԱԶԱՅՆԻ
ՆԵՐԳՈՐԾՈՒԹՅԱՆ ՊԱՅՄԱՆՆԵՐՈՒՄ**

Վ. Հ. ԲԱՐՍԵԳՅԱՆ, Գ. Թ. ԱԴՈՒՆՑ, Լ. Վ. ՍԱՐԿԻՍՅԱՆ

Ուսումնասիրվել է հիմնային ֆոսֆատազայի ակտիվությունը ցինկի, որոշ ամինաթիոնների, ուտրաձայնի համատեղ և կոմբինացված ազդեցության պայմաններում:

Յուշ է տրված, որ ցիստեինը, հիստիդինը ինչպես նաև ուտրաձայնի ազդեցությամբ առաջացած ազատ ուղիկալային նյութերը կապվում են ցինկի և ոչ թե ֆենիլալանինի հետ:

Ենթադրվում է, որ ի տարբերություն ցիստեինի և հիստիդինի, ֆենիլալանինի ընկճող ազդեցությունը կապված է սպիտակուցի ոչ թե ակտիվ, այլ ալոստերիկ կենտրոնում առաջացող փոփոխությունների հետ:

**THE REGULATING EFFECT OF SOME AMINOACIDS ON THE
ACTIVITY OF PHOSPHOMONOESTERASES UNDER THE USE
OF SUPERSOUND**

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

The effect of supersonic sound on aminoacids, which evoke certain changes in the catalytic activity of alkaline phosphatase has been studied. It has been shown that cysteine, histidine and products formed under sonication are connected with zink but not with L-phenylalanine. For the latter the observed regularities do not take place because its inhibition is connected with allosteric but not active centre of the studied enzyme.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Адуңц Г. Т., Саркисян Л. В. Биолог. ж. Армении, 26, 2, 22, 1974.
2. Адуңц Г. Т., Саркисян Л. В., Барсегян В. О. Тез. докл., IV Всесоюзн. съезд биохимиков, Л., 1979.
3. Барсегян В. О., Саркисян Л. В., Адуңц Г. Т. Биолог. ж. Армении, 30, 11, 1978.
4. Кочетов Г. А. Практическое руководство по энзимологии, 108, М., 1971.
5. Шлыгин Г. К., Михлин С. Я. Вопросы мед. химии, 1, 461, 1955.
6. Ahless J. Biochem J., 141, 1, 257, 1974.
7. Ahlers Jan. Z. Naturforsch., 30a, 11—12, 829, 1975.
8. Buther W. W., Westheimer F. H. J. Am. Chem. Soc., 77, 2420, 1955.
9. Cohn M. J. Biol. Chem., 201, 735, 1953.
10. Fait G. H., Vallee B. L. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1247, 1966.
11. Fishman W. H., Green S., Inglis N. I. Nature, 198, 4881, 685, 1963.
12. Kennedy F. S., Hill H. A. O., Kaden T. A., Vallee B. L. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 48, 6, 1533, 1972.