ՀԱՅԿԱԿԱՆ ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ ՀԱՆԴԵՍ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ АРМЕНИИ
XXXIV, 8, 841—844, 1981

УДК 577.15

ВОЗДЕЙСТВИЕ КОМПЛЕКСООБРАЗУЮЩИХ АМИНОКИСЛОТ НА АКТИВНОСТЬ ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ

Г. Т. АДУНЦ, Л. В. САРКИСЯН

Изучена роль серин-гистидинового комплекса, а также эффектов отдельных аминокислот в регуляции деятельности очищенной щелочной фосфатазы. Показано, что при блокировании четвертичной структуры цинком гистидин утрачивает способность воздействовать на активность изучаемого фермента. Гистидин и серин способны включаться в синтез целого ряда хелатных структур и связываться с ионами более прочно, чем другие аминокислоты. По-видимому, они принимают непосредственное участие в образовании комплексов ионов металлов с белками.

Ключевые слова: щелочная фосфатаза, аминокислоты, ионы металлов.

Скорость ферментативных процессов обусловлена множественными факторами, прямо или косвенно влияющими на ход реакций. В большинстве случаев это природные соединения, образующиеся при обмене веществ, концентрация которых меняется в течение времени, регулируя деятельность фермента. В этом отношении особое место занимают некоторые аминокислоты, изменяющие, как известно, деятельность щелочной фосфатазы (КФ 3.1.3.1). В одном случае аминокислота (цистеин), действуя на активный центр, подавляет активность фермента, в другом (L-фенилаланин) — изменяет четвертичную структуру его и, соединяясь с аллостерическим центром, также подавляет ферментативную активность [1, 2, 3]. Ряд аминокислот (глутаминовая, аспарагиновая кислоты и лизин), являясь аллостерическим регулятором по отношению к щелочной фосфатазе, повышает ферментативную активность [2].

Щелочная фосфатаза относится к сериновым ферментам, деятельность которых осуществляется через активную гидроксильную группу серина. Вместе с гистидином они образуют серин-гистидиновый комплекс, роль которого хорошо изучена в структурах таких ферментов, как α-химотрипсин (КФ 3.4.4.5), трипсин (КФ 3.4.4.4.), тромбин (КФ 3.4.4.13), карбоксиэстераза (КФ 3.1.1.1.), холинэстераза (КФ 3.1.1.8), арилэстераза (КФ 3.1.1.2) и фосфоглукомутаза (КФ 2.7.5.1) [4]. Однако в литературе нет сведений относительно роли серин-гистидинового комплекса в деятельности щелочной фосфатазы, в связи с чем целью настоящей работы явилось изучение его действия, а также эффекторов отдельных аминокислот на активность фермента.

Материал и методика. Опыты ставились на очищенной щелочной фосфатазе фирмы «Reanal» (ВНР), выделенной из тонких кишок цыплят. Субстратом для изучае-

мого фермента служил пара-нитрофенилфосфат («Reanal») в концентрации $2 \cdot 10^{-3}$ М в медиаловом буфере (pH 9,6). Об активности фермента судили по нарастанию количества пара-нитрофенола в течение 10 и 30 мин. Интенсивность окраски фотометрировали при длине волны 420 нм. В ходе опытов старались поддерживать оптимальную активность, т. е. расщепление фермента субстратом в реакционной смеси на 50%. Нами было испытано действие гистидина в концентрациях 10^{-2} — $5 \cdot 10^{-6}$, серина — $2 \cdot 10^{-2}$—10^{-6}, цинка — 10^{-3} и цистеина 10^{-2} и 10^{-3} М. Концентрация фермента в реакционной среде поддерживалась в пределах 0,07 Е при заданных стандартных условиях.

Результаты и обсуждение. Из литературы известно, что фосфомоноэстеразы свою каталитическую функцию осуществляют через серин, находящийся в активном центре фермента, по принципу луш-пульные механизмы: электрофильно-нуклеофильные каталазы. Для фосфатаз, имеющих оптимум pH в щелочной зоне, необходимы соответствующие количества двухвалентных металлов, которые выступают в качестве кофакторов для компенсации зарядов на фосфатной группировке и облегчения нуклеофильной атаки гидроксильной группы серина на фосфор, катализируемой основанием гистидина [5]. В этом отношении представляет интерес изучение серин-гистидинового комплекса. Прежде чем изучить действие этого комплекса на щелочную фосфатазу, необходимо было установить факт существования связи между ферментативной активностью и концентрациями отдельных реагентов (серина и гистидина).

Из полученных данных вытекает, что наивысшая степень активности щелочной фосфатазы достигается при действии гистидина в концентрациях 10^{-3}, $5 \cdot 10^{-4}$ и 10^{-4} М (максимальная активация проявляется при концентрации 10^{-3} М), при снижении ее до $5 \cdot 10^{-5}$, 10^{-5} и $5 \cdot 10^{-6}$ М происходит постепенное исчезновение активирующего эффекта. При высоких же концентрациях гистидина, наоборот, наблюдается примерно двукратное подавление ферментативной активности. Активирование фермента под влиянием серина происходит при концентрациях 10^{-3}, $5 \cdot 10^{-4}$ М, в остальных же случаях имеет место либо слабое влияние, либо полное отсутствие его.

На рис. 1 показаны результаты влияния серина и гистидина как совместно, так и в отдельности на активность щелочной фосфатазы. Брали максимально эффективные концентрации этих реагентов (10^{-3} М). Из приведенных данных следует, что серин и гистидин, взятые в отдельности, влияют на фермент гораздо эффективнее, чем при совместном применении. Выявлено также образование серин-гистидинового комплекса как с ферментом, так и без него, менее активного, чем серин или гистидин в отдельности. В случае уменьшения концентраций реагентов до $5 \cdot 10^{-4}$, 10^{-4} М эффект сохраняется, даже в том случае, когда в реакционной среде увеличивают количество фермента (в стандартных условиях—100 γ фермента в 5 мл реакционной смеси) до 250 γ, 500 γ. Однако при увеличении концентрации фермента имеет место спад активирующего эффекта реагентов в реакционной среде, что доказывает недостаточность насыщения фермента действующими реагентами. Этот эффект нагляден в отношении серина.

Ранее нами было установлено полное блокирующее действие высоких концентраций цистеина в отношении цинка активного центра щелочной фосфатазы. Кроме того, известно ассоциирующее действие цинка, который из неактивных мономеров образует активную форму субъ-

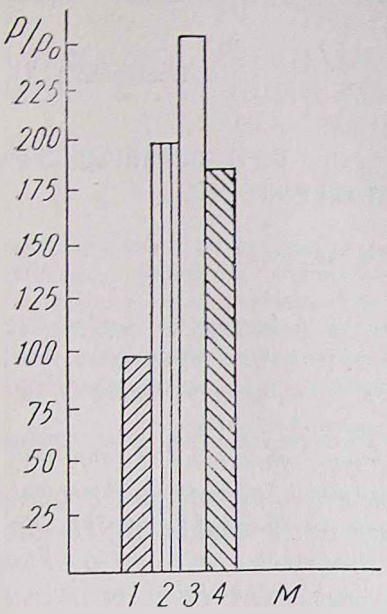

Рис. 1.

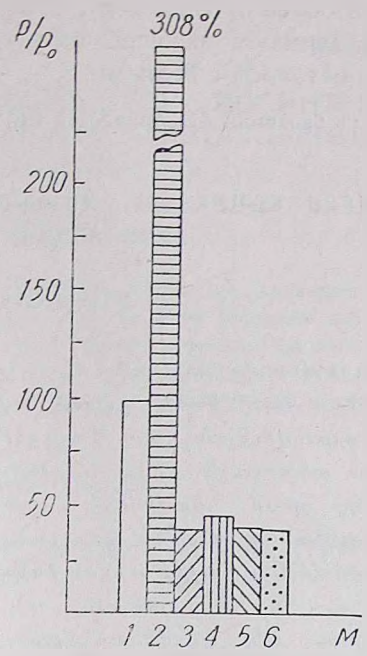

Рис. 2.

Рис. 1. Комплексное действие гистидина и серина на активность очищенной щелочной фосфатазы. Инк. 10 мин при 30°. 1—норма, 2—серин 10^{-3} М, 3 — гистидин 10^{-3} М, 4 — серин + гистидин 10^{-3} М.

Рис. 2. Комплексное действие гистидина и цинка на активность очищенной щелочной фосфатазы. Инк. 10 мин при 30°. 1—норма, 2—гистидин 10^{-3} М, 3 — цинк $5 \cdot 10^{-5}$ М, 4 — цинк 10^{-4} М, 5 — гистидин 10^{-3} М+цинк 10^{-4} М, 6 — гистидин 10^{-3} М + цинк $5 \cdot 10^{-5}$ М.

единиц фермента [1]. В этом плане интересно было изучить влияние 10^{-3} М гистидина на активность щелочной фосфатазы в присутствии цистеина и цинка. Было установлено, что при концентрации цистеина 10^{-3} М в среде гистидин не проявляет своего активирующего действия, наоборот, активность фермента остается на том же уровне, что и при ингибировании цистеина. Аналогичные данные отмечены при действии гистидина на фермент в присутствии цинка (рис. 2).

Приведенные данные могут быть объяснены блокированием четвертичной структуры цинком, после чего гистидин теряет способность действовать на активность изучаемого фермента. Добавочное количество цинка в реакционной среде способствует образованию хелатного соединения с входящими в молекулу фермента некоторыми аминокислотами. В случаях связывания ионов металлов с двумя и более атомами одного

лиганда происходит образование хелатного комплекса. Все аминокислоты могут образовать с ионами металлов хелатные комплексы, но особый интерес представляют серин и гистидин, способные включаться в комплекс целого ряда хелатных структур и связываться с ионами металлов более прочно, чем любые другие аминокислоты. По-видимому, они принимают непосредственное участие в образовании комплексов ионов металлов с белками.

Институт биохимии АН Армянской ССР

Поступило 19.XI 1980 г.

ԿՈՄՊԼԵՔՍ ԱՌԱՋԱՑՆՈՂ ԱՄԻՆԱԹԹՈՒՆԵՐԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ՀԻՄՆԱՅԻՆ ՖՈՍՖԱՏԱԶԱՅԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՎՐԱ

Գ. Թ. ԱԴՈՒՆՑ, Լ. Վ. ՍԱՐԳՍՅԱՆ

Ուսումնասիրվել է սերինի, հիստիդինի և նրանց համատեղ ազդեցությունները հավի ճտերի բարակ աղիներից ստացված հիմնային ֆոսֆոտազայի ակտիվության վրա։ Պարզվել է, որ հիստիդինը և սերինը գրեթե 2—3 անգամ ակտիվացնում են ֆերմենտի գործունեությունը։

Ընդ որում, հիստիդինի ազդեցությունը գերիշխում է սերինին։ Նույն ամինաթթուների համատեղ ազդման ժամանակ էֆեկտի կրկնապատկում չի նկատվում։ Սա թույլ է տալիս ենթադրելու, որ հիստիդինը սերինի հետ առաջացնում է մի միացություն, որն իր գործունեությամբ ավելի թույլ ազդեցություն ունի ֆերմենտի վրա, քան այդ ամինաթթուները առանձին-առանձին։

Ցինկով ճնշված ֆերմենտի ակտիվությունը չի վերականգնվում հիստիդինով։ Ըստ երևույթին, ցինկի մեծ կոնցենտրացիաները խոր փոփոխություններ են մտցնում ֆերմենտի չորրորդային ստրուկտուրայի մեջ։

THE EFFECT OF COMPLEXFORMING AMINOACIDS ON ALKALINE PHOSPHATASE ACTIVITY

G. T. ADUNTZ, L. V. SARKISSIAN

The role of serine-hystidine complex and the effect of several aminoacids on purified alkaline phosphatase activity have been studied.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Адунц Г. Т., Саркисян Л. В.* Биолог. ж. Армении, *26*, 2, 22, 1973.
2. *Адунц Г. Т., Барсегян В. О., Саркисян Л. В., Адунц Г. Г.* Биолог. ж. Армении, *30*, 9, 19, 1977.
3. *Fishman W. H., Green S., Inglis N. I.* Nature, *198*, 4881, 685, 1963.
4. *Dixon G. H., Neurath H. J.* Am. Chem. Soc., *79*, 4558, 1957.
5. *Buther W. W., Westheimer F. H. J.* Am. Chem. Soc., *77*, 2420, 1955.