

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ОКСИДАЗЫ D-АМИНОКИСЛОТ, ОЧИЩЕННОЙ ИЗ ПЕЧЕНИ ЛЯГУШКИ

Р. Р. ПЕТОЯН, М. А. ДАВТЯН

Ереванский государственный университет, кафедра биохимии

Аннотация — Методами спектрофотометрирования и флуоресценции изучалось комплексобразование между апопротеином и простетической группой очищенного препарата оксидазы D-аминокислот лягушки, исследована также кинетика зависимости мономер-димерного равновесия от концентрации ферментативного белка. Исследование влияния ПХМБ на активность фермента выявило его тиоловую природу. Молекулярный вес очищенного фермента, определенный методом электрофореза в ПААГ в присутствии SDS, равен 40.000 ± 1000 .

Անոտացիա — Ապոպրոթեյնամեկտրի և ֆլուորեսցենցիայի մեթոդներով ուսումնասիրվել է կոմպլեքսառաջացումը ապոպրոթեյնի և զտրված D-ամինաթթուների արտիդագոզի մաքրված պրեպարատի միջև. ուսումնասիրվել է նաև մոնոմեր-դիմերային հավասարակշռության կախումը ֆերմենտային սպիտակուցի կոնցենտրացիայից: Ֆերմենտային ակտիվության վրա ՊՔԽԲ-ի ազդեցության ուսումնասիրությունները ցույց են տվել նրա թրոպային բնույթը: Մաքրված ֆերմենտի մոլեկուլայն կշիռը, որոշված ՊՔԽԲ-ում էլեկտրաֆորեզի մեթոդով SDS-ի ներկայությամբ, հավասար է 40.000 ± 1000 -ի:

Abstract — The complexformation between apoprotein and prostetic group, purified from the preparation of frog D-amino acids oxidase has been studied by spectrophotometry and fluorescence, kinetics of dependence of monomer-dimeric balance upon the concentration of enzymatic protein has been studied, too. The study of PChMB influence on the activity of enzyme has shown its thiolic nature. The molecular weight of the purified enzyme, defined by the method of electrophoresis in PAAG in the presence of SDS, is equal to 40.000 ± 1000 .

Ключевые слова — печень лягушки, оксидаза D-аминокислот, апопрот.ин. ФАД, K_m — константа Михаэлиса, K_i — константа ингибирования.

Аминокислотные оксидазы служили биологической науке многие годы как уникальные биохимические объекты для выявления ряда принципиальных энзиматических вопросов. Вскоре после их открытия оксидазы D-аминокислот были использованы Варбургом и Криптианом [9] в своих фундаментальных исследованиях, касающихся флавинадениндиуклеотида (ФАД). Считается установленным, что простетической группой оксидазы D-аминокислот является ФАД и что он ковалентной связью соединен в активном центре фермента [8].

Одна из характерных особенностей флавопротеинов заключается в том, что они проявляют значительные различия в спектрах поглощения не только между собой, но и со свободной простетической группой. Эти

свойства можно использовать для контроля рекомбинации ФАД с апопротенином, так как последний не имеет поглощения в видимой области. Спектрофотометрический и флуоресцентный анализы комплекса апопротенина с ФАД обеспечивают ценной информацией относительно природы этих связей, так как свободный ФАД имеет специфический адсорбционный спектр, который может быть изменен при комбинировании с апопротенином [5].

Литературные данные о молекулярном весе фермента млекопитающих весьма разноречивы [3—5], от 37.600 до 115.000. Такое расхождение, как предполагают авторы [3, 6, 12], обусловлены особенностями мономер-димерного равновесия, выражающимися главным образом в полимеризации мономерной формы фермента при повышении концентрации и температуры [6]. Определение молекулярного веса частично очищенных препаратов фермента осложняется также присутствием высокомолекулярных примесей. Лишь при высокой степени очистки, когда удаляются указанные примеси, стабилизируются результаты определения молекулярных весов фермента [5, 13].

Ранее нам удалось провести довольно высокую очистку печеночного фермента без использования стабилизаторов и получить высокоактивный фермент со степенью очистки, равной 1013,5, и удельной активностью 225 мкмоль/мг/час [1].

В настоящей работе приводятся результаты изучения некоторых физико-химических свойств фермента.

Материал и методика. Опыты проводили на очищенной оксидазе D-аминокислот печени лягушки *Rana ridibunda* (лягушка озерная).

Молекулярный вес и гомогенность фермента определяли методом электрофореза в ПААГ (полиакриламидном геле) в присутствии SDS по Веберу и Осборну [10]. Электрофорез проводили в 10%-ном геле, используя в качестве метки 0,01%¹⁰-ный раствор бромфенольного синего. Белковые зоны окрашивали кумассей синим (0,001%¹⁰-ный раствор на 7%-ной уксусной кислоте). Для приготовления апопротенина из очищенного фермента использовали метод Массы и Курти [7]. Диализ проводили при -4° Диализный раствор, 0,1 М калий-фосфатный буфер (рН 8,3), содержал 3×10^{-3} М ЭДТА и КВг. Полученный апопротенин активен несколько недель при 0° и несколько месяцев — при -20°.

УФ-спектры поглощения апопротенина, ФАД и фермента измеряли на спектрофотометре «Spectord» (ГДР) при 20°. Активность фермента определяли по количеству выделявшегося при инкубации с субстратом (D-метионином) аммиака, который определяли по методу Зеллинсона в модификации Сяликовой [2]. В работе использовали ФАД ФМН, АДФ, АМФ (Sigma Grad III, США), остальные реактивы марки «х.ч.»

Результаты и обсуждение. Полученные данные показали, что смешивание апопротенина с ФАД сопровождается изменениями в спектре поглощения, флувиновой флуоресценции и восстановленном каталитической активности. Из рис. 1 видно, что если максимальное поглощение ФАД наблюдается при 263 нм, а апопротенина — при 280 нм, то после их смешивания появляется максимум поглощения при 269 нм. По-видимому, в результате смешивания образуется комплекс ФАД-апопротенин с максимумом поглощения при 269 нм и с восстановленным ка-

каталитической активности, что отмечается и в отношении оксидаз почем млекопитающих [11].

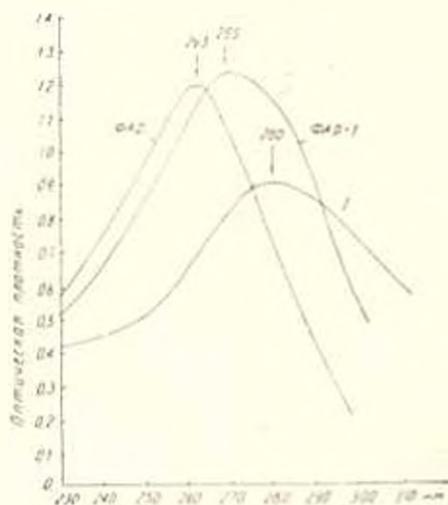


Рис. 1. Спектры поглощения: ФАД— 4×10^{-4} М; 1—апопротеина— $8,2 \times 10^{-4}$ М; ФАД+1—ФАД-апопротеин (1:2).

Результаты изучения флуоресценции ФАД при добавлении апопротеина подтвердили это предположение. Наблюдаемая при этом (рис. 2) кинетика снижения интенсивности флуоресценции ФАД указывает на

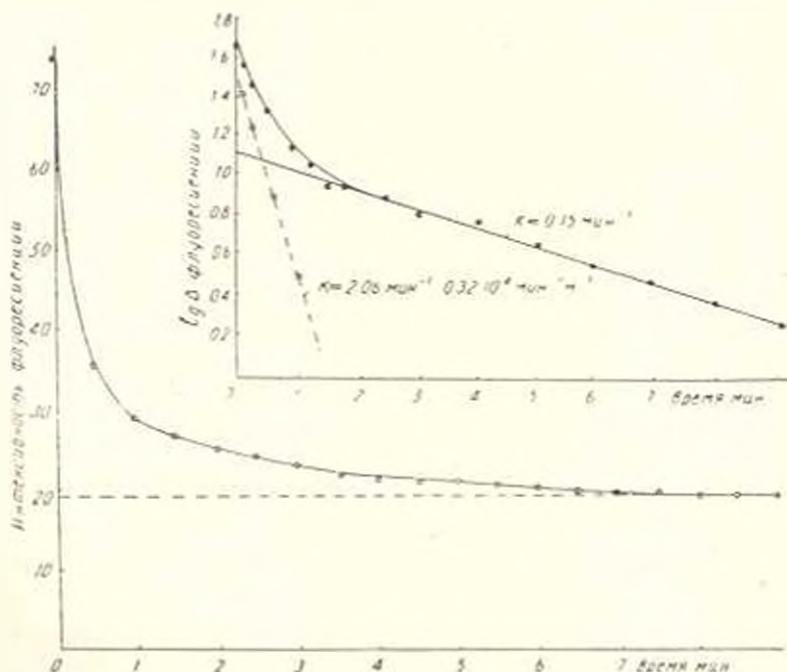
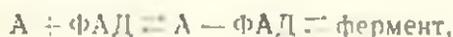


Рис. 2. Изменения во флавиновой флуоресценции при смешивании 4×10^{-6} М хроматографически чистого ФАД с $6,25 \times 10^{-4}$ М апопротеином при 15° (возбуждение—470 нм, эмиссия—530 нм). А—график уравнения первого порядка; В—график уравнения псевдопервого порядка.

то, что комплексобразование происходит в две стадии: первоначальное быстрое связывание ФАД (первая минута) переходит в стадию медленных вторичных изменений внутри комплекса ФАД—апопротеин. По-

следние имеют постоянную скорость, равную 0.15 min^{-1} , и не зависят от концентрации апоротенна, в то время как быстрая стадия находится в зависимости от концентрации.

Если принять, что взаимодействие протекает со следующей последовательностью



то константа скорости псевдопервого порядка для быстрой фазы может быть вычислена приблизительно, путем вычитания воздействия медленной фазы и вычерчиванием кривой разницы. Эта линия (пунктирная линия на рис. 3) соответствует константе скорости псевдопервого

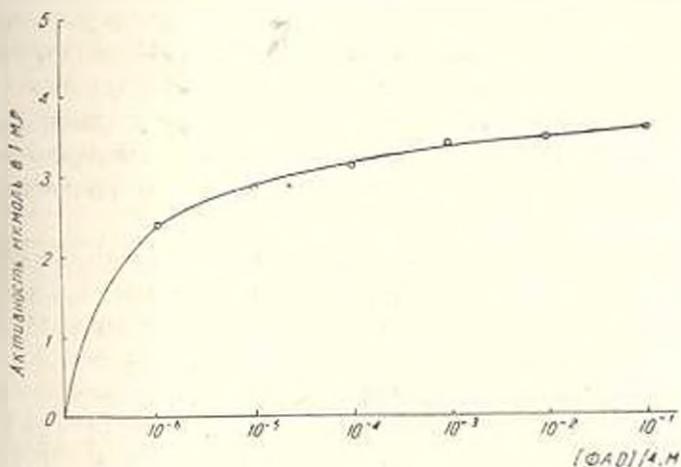


Рис. 3. Кривая титрования апоротенна ($6.25 \times 10^{-4} \text{ M}$) ФАД.

порядка, равной 2.05 min^{-1} . При известной концентрации апоротенна, равной $6.25 \times 10^{-4} \text{ M}$, константа скорости второго порядка равна $0.32 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1} \text{ M}^{-1}$.

Кривая титрования апоротенна ФАД (рис. 4) показывает, что при концентрации ФАД, равной $4 \times 10^{-4} \text{ M}$, происходит насыщение апоро-

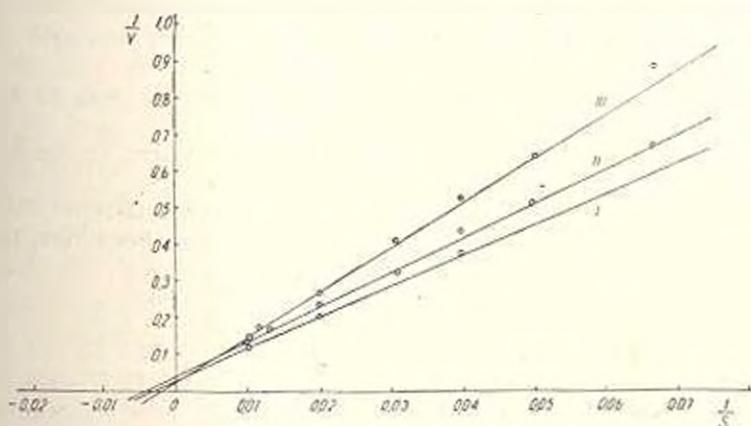


Рис. 4. Графики Лайнувера-Бэрка для трех различных концентраций очищенного фермента: I — $5 \times 10^{-4} \text{ M}$; II — $1 \times 10^{-4} \text{ M}$; III — $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ (K_m — 2.5×10^{-4} ; 3.7×10^{-4} ; $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ соответственно).

тенна и полное восстановление активности. При титровании его ФМН, АМФ и АДФ, в тех же условиях, не наблюдается восстановления каталитической активности.

На основании этих данных можно сделать вывод, что именно ФАД является простетической группой оксидазы D-аминокислот.

Определение молекулярного веса очищенного фермента, проводимое в соответствии с методикой электрофореза в 10%-ном ПААГ в присутствии SDS, показало, что полученный нами очищенный фермент гомогенен и имеет молекулярный вес, равный 40.000 ± 1000 . Эта величина близка значениям молекулярных весов, наблюдаемых и для оксидаз млекопитающих [12, 13].

Считается установленным существование мономер-димерного равновесия ($M \rightleftharpoons D$) у фермента млекопитающих [14], а также смещение $M \rightleftharpoons D$ равновесия в сторону образования мономера при понижении концентрации ферментного белка, pH и температуры раствора или же при повышении концентрации ионов Cl^- [3, 15]. Это наглядно видно и на нашем препарате при исследовании K_m и V_{max} очищенного ферментного раствора различных концентраций.

Как видно из рис. 5, с понижением концентрации значения K_m и V_{max} увеличиваются, что согласуется с литературными данными [15].

Следовательно, можно предположить существование $M \rightleftharpoons D$ равновесия и у печеночной оксидазы D-аминокислот амфибий.

При изучении влияния ПХМБ (p-хлормеркурибензоат) оказалось, что активность фермента ингибируется на 92% при 10^{-3} М концентрации ПХМБ, на 69% — при 10^{-4} М, на 53% — при 10^{-5} М. Соответственно K_i равны $1 \cdot 10^{-2}$; $1,6 \times 10^{-2}$; $1,06 \times 10^{-1}$ М.

Таким образом, изученный фермент имеет тиоловую природу. К подобному заключению приходят и другие авторы в отношении оксидазы D-аминокислот млекопитающих.

ЛИТЕРАТУРА

1. Петоян Р. Р., Давтян М. А. Биолог. ж. Армении, 39, 9, 99, 1986.
2. Сузакова Я. И., Труш Г. П., Явилкова А. Вопросы мед. хим., 8, 538, 1962.
3. Antonini E., Brunori M., Bruzzesi M. B., Chiancone E. and Massey V. J. Biol. Chem., 241, 2358, 1966.
4. Charlwood P. A., Palmer G. and Bennet R. Biochem. Biophys. Acta, 50, 17, 1961.
5. Henn S. W. and Ackers G. K. J. Biol. Chem., 244, 465, 1969.
6. Herlike K., Shiga K., Isomoto A., and Yamano T. J. Biochem., 75, 925, 1974.
7. Massey V. and Curti B. J. Biol. Chem., 241, 3417, 1965.
8. Singer T. P., and Kenney W. C. In: Vitamins and Hormones (Hurries R. S., Diezfelusy E., Munson P. L., and Glover J., eds), Academic Press, New York, 32, 1-46, 1974.
9. Warburg O., Christlan W. Biochem. Ztschr., 295, 294, 1938.
10. Weber K. and Osborn M. J. Biol. Chem., 244, 4106, 1969.
11. Yagi K. and Ozawa T. Biochem. Biophys. Acta, 55, 413, 1962.
12. Yagi K. and Ozawa T., Harada M. Symp. Enzyme Chem., 14, 87, 1960.
13. Yagi K., Nuoji M., Harada M., Okamura K., Hidaka H., Ozawa T. and Kotani A. J. Biochem., 61, 580, 1967.
14. Shiga K. and Shiga T. Biochem. Biophys. Acta, 265, 294, 1972.
15. Yagi K., Stigura N., Osana H. and Ohishi N. J. Biochem., 73, 903, 1973.