

как во всех других случаях K^+ поступает по градиенту электрического поля [3]. Нами было показано, что добавление в среду N,N' -дицикло-гексилкарбодимида — ингибитора H^+ -АТФазы, не изменяя величины $\Delta\phi$, подавляет функции только мультиферментного комплекса у анаэробов, где H^+ -АТФаза важна для поглощения K^+ [1]. Это подтверждается и тем, что добавление арсената, блокирующего образование АТР, также сказывается только на поглощении ионов K^+ у анаэробов, выращенных без нитрата и присутствии лактата в качестве экзогенного источника энергии (не показано).

Лактат, деградируя до ацетата, способствует образованию одной молекулы АТР. В то же время в параллельном пути образуется формат. Этим и объясняется то, что мультиферментный комплекс получает как энергию (через H^+ -АТФазу), так и восстановительные эквиваленты от формат-водород лиазы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баграмян К. А., Мартиросов С. М. Биофизика, (в печати).
2. Готтшальк Г. Кн.: Метаболизм бактерий, 147, М., 1982.
3. Мартиросов С. М., Грчунян А. А. Биофизика, 31, 626, 1986.
4. Варданян А. Г., Мартиросов С. М. Биофизика, 31, 833, 1986.
5. Martirosov S. M., Trechotin A. A. Bioelectrochem. Bioenerg., 9, 459, 1982.

Поступило 30.XI 1988 г.

Биолог. ж. Армении, № 11, (42), 1989

УДК 577.158:658.152

ВЛИЯНИЕ ИОНОВ МЕТАЛЛОВ НА УРИКАЗУ ИЗ *BACILLUS FASTIDIOSUS*

С. Ш. ТАТЯКЯН, А. П. СИМОНЯН

Ереванский физический институт ГКАЗ СССР

Показано, что ионы меди в концентрации 10^{-6} М приводят к увеличению активности уриказы из *B. fastidiosus* в среднем на 10%, в концентрации $5 \cdot 10^{-3}$ М — к ингибированию на 57%. ЭДТА не влияет на активность фермента. Имобилизованная уриказа до концентрации $5 \cdot 10^{-2}$ М не чувствительна к ионам меди. Имобилизация фермента в присутствии высоких и низких концентраций ионов меди приводит соответственно к уменьшению или увеличению активности препарата. Сделан вывод о том, что Cu^{2+} не входит в состав активного центра, а играет регуляторную роль.

Մերս է տրվում, որ 10^{-6} М խտության զնայում պղնձի իոնները հանգեցնում են *B. fastidiosus*-ից ուրիկազայի ակտիվության միջին հաշվով 10% աճին, իսկ $5 \cdot 10^{-3}$ Մ խտության զնայում՝ 57% նվազանք: EDTA-ն չի ազդում ֆերմենտի ակտիվության վրա: Իմոբիլիզացված ուրիկազան միջին $5 \cdot 10^{-2}$ Մ խտությունը զգալուն չէ պղնձի իոնների նկատմամբ: Ֆերմենտի իմոբիլիզացումը պղնձի իոնների բարձր և ցածր խտությունների ապակայանների զնայում համապատասխանաբար բերում է պատրաստուկի ակտիվության նվազման կամ աճին: Ընթացվում է, որ Cu^{2+} չի մտնում ակտիվ կենտրոնի կազմի մեջ, բայց խաղում է կարգավորիչ դեր:

It has been shown that ions of copper 10^{-6} M concentration bring to the increase of the activity of uricase from *Bac. fastidiosus* for 10 per cent on average, in $5 \cdot 10^{-4}$ M concentration — to the inhibition for 57 per cent. EDTA does not influence the activity of enzyme. Up to $5 \cdot 10^{-2}$ M concentration the immobilized uricase is not sensitive to copper ions. In the presence of high and low concentrations of copper ions immobilization of the enzyme brings to corresponding decrease or increase of the activity of the preparation. It is concluded that Cu^{2+} does not enter the composition of the active centre, but plays a regulatory role.

Уриказа В fastidiosus—ионы металлов—иммобилизация.

Большинство оксидаз, использующих в качестве акцептора электронов кислород, содержит в своем составе один из окислительно-восстановительных коферментов—FAD, FMN и др. В отличие от них, в составе уриказы не обнаружен ни один из известных кофакторов. Некоторые авторы считают, что уриказа является медьсодержащим ферментом [7, 8], однако роль ионов меди в уриказном катализе окончательно не установлена.

Настоящая работа посвящена изучению влияния ряда ионов металлов, в частности меди, на нативную и иммобилизованную уриказу.

Материал и методика. Уриказу выделили из *Bac. fastidiosus*, выращенных в жидкой синтетической среде, содержащей в качестве единственного источника углерода и азота мочевую кислоту [3]. Чистоту препарата проверяли электрофорезом в ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия. Иммобилизацию проводили на силикагеле, предварительно аминированном γ -аминопропилтриэтоксисиланом и активированием глутаровым альдегидом по методике Робинсона [9].

Активность определяли амперометрически, регистрируя скорость потребления кислорода в ходе ферментативной реакции с помощью электрода Кларка на полярографа РА-2 (ЧССР). Для этого ячейку объемом 5 мл заполняли 5 мМ раствором мочевиной кислоты в 59 мМ Трис-НСI буфере (рН 8,8), содержимое ячейки перемешивали мешалкой и после установления тока электрода реакцию запускали введением 50 мкл раствора фермента. За единицу активности принимали количество фермента, потребляющего 1 мкмоль кислорода в мин.

При исследовании влияния ионов металлов на активность уриказы в ячейку перед запуском реакции добавляли 10—100 мкл раствора соответствующих солей для получения необходимых концентраций ионов в ячейке.

В работе использовали Трис, глутаровый альдегид и набор реактивов для электрофореза («Reanal», Венгрия), додецилсульфат натрия и кумасси голубой («Merk», ФРГ) и реактивы отечественного производства.

Результаты и обсуждение. Одним из наиболее простых тестов для определения роли ионов металлов в ферментативном катализе является исследование влияния этих ионов на активность фермента. Если ион, входящий в состав фермента, частично или полностью утрачивается при очистке, добавление металла приводит к резкому увеличению активности.

Мы исследовали влияние ряда двухвалентных ионов на уриказу в довольно широком диапазоне концентраций. В этих и последующих экспериментах использована электрофоретически гомогенная уриказа. По приведенным в табл. данным видно, что Mg^{2+} и Co^{2+} практически не действуют на активность уриказы. Особенно интересным является действие ионов меди на фермент. Низкие концентрации их приводят к повышению активности уриказы (рис. 1). Влияние ионов металлов на

уриказу исследовалось и в работе Бонгерса и др. [4], в которой авторы использовали уриказу из другого штамма *B. fastidiosus*. Однако они рассматривали область относительно высоких концентраций (10^{-5} — 10^{-6} М), где, как и в наших экспериментах, наличие как ионов меди, так и других металлов в реакционной среде приводит к падению активности фермента в большей или меньшей степени.

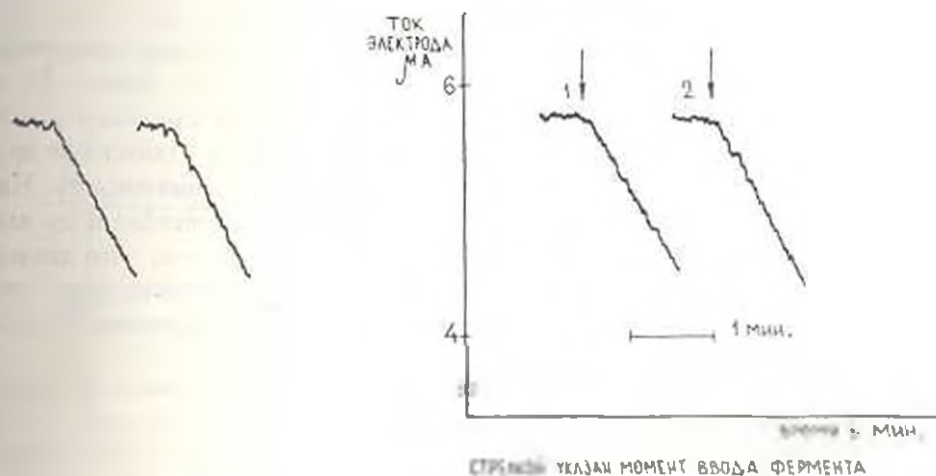


Рис. 1. Влияние ионов меди на начальную скорость уриказной реакции. 5 мМ мочева кислота и 50 мМ Трис-НСI буфере, pH 8,8, 25°, насыщение кислородом воздуха. Концентрация уриказы— $5 \cdot 10^{-8}$ М. 1—контроль, 2— 10^{-6} М.

Изучение влияния ионов меди на константу Михаелиса показало, что K_m как для кислорода, так и для моченой кислоты при этом не меняется. При высоких концентрациях Cu^{2+} происходит скорее всего бесконкурентное ингибирование (рис. 2). Ранее мы сообщали, что зави-

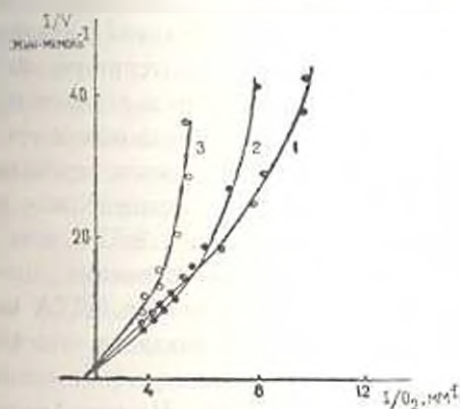


Рис. 2.

Зависимость скорости уриказной реакции от концентрации кислорода при разных концентрациях ионов меди. Условия те же, что и на рис. 1. 1—контроль, 2— 10^{-6} М $CuSO_4$, 3— $5 \cdot 10^{-3}$ М $CuSO_4$.

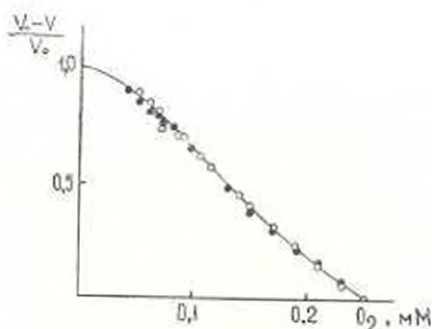


Рис. 3.

Зависимость скорости уриказной реакции от концентрации кислорода в присутствии ЭДТА. Условия те же, что и на рис. 1. Концентрация ЭДТА—2 мМ. ○—○—контроль ●—●—●—+ ЭДТА

действие уриказы с кислородом носит кооперативный характер [3]. Наличие ионов меди, как видно из рис. 2, приводит к усилению этого эффекта. Наблюдаемое более резкое снижение активности фермента при уменьшении концентрации кислорода нельзя объяснить инактивацией уриказы при длительной инкубации фермента с ионами меди. Эксперименты показывают, что инкубация уриказы с Cu^{2+} в течение 20–30 мин, которые затрачиваются для записи кинетической кривой, не приводят к дополнительной инактивации фермента.

Как уже отмечалось, некоторые исследователи считают, что уриказа является медьсодержащим ферментом. Конлей и Прайст [5] в своей работе приводят факт ингибирования уриказы цианидом и гидроксиплазмином, причем степень инактивации фермента зависит от времени его инкубации с ингибитором в присутствии мочевой кислоты. Ингибирование уриказы цианидом обнаружили также Кисселла и др. для фермента из печени рыб [6]. Авторы объясняют это тем, что цианид убирает из активного центра фермента одновалентные ионы меди, что приводит к его инактивации. Однако, если в составе активного центра

Влияние ионов металлов на активность уриказы, %

Внесен- ный ка- тион ***	Концентрация соли, М						
	Контроль	10^{-6}	$5 \cdot 10^{-6}$	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}	$5 \cdot 10^{-3}$
Ni 2+	100±0.9	95.6±1.7	—	89.3±2.3	60.2±1.8	33.9±1.6	15.5±1.4
Co 2+	100±1.2	—	100.0±1.1	98.3±2.1	88.8±1.5	83.3±1.4	83.3±1.7
Mg 2+	100±2.1	100.0±1.6	—	97.8±1.2	95.5±0.7	95.9±1.3	91.3±4.5
Cu 2+	100±1.6	100.9±2.9*	104.5±1.8*	102.3±1.9	95.1±1.3	78.1±1.5	42.8±1.0

* $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; *** Все катионы вводили в реакционную среду в виде сульфатов.

уриказы присутствуют ионы меди, они не могут постоянно оставаться в одновалентном состоянии. Следует учесть, что уриказный катализ осуществляется путем двухэлектронного переноса. В литературе известны различные механизмы двухэлектронного переноса с участием ионов меди. Во всех этих моделях хотя бы на каком-нибудь одном этапе фигурирует двухвалентный ион меди [1]. Наличие такого перехода предполагается также в схеме уриказного катализа, приведенного в работе Питса и Прайста [8]. В этом случае присутствие ЭДТА, который образует хелатные соединения с двухвалентными катионами, должно привести к ингибированию фермента. Но присутствие ЭДТА не влияет на активность уриказы. Наши эксперименты показали, что ни предварительная инкубация фермента с ЭДТА, ни присутствие его в реакционной среде не приводят к инактивации фермента. На рис. 3 приведена зависимость скорости уриказной реакции от концентрации кислорода в присутствии ЭДТА. Как видно из рисунка, во всем исследованном диапазоне концентраций кислорода ход обеих реакций—без ЭДТА и с ЭДТА—достаточно хорошо совпадает. Это говорит о том, что характер зависимости активности фермента от концентрации кислорода не меняется при добавлении в реакционную среду ЭДТА. Кроме

того, результаты эксперимента получены при непрерывной регистрации хода реакции, тем самым исключается ингибирование фермента во времени, как цианидом в экспериментах Конлея и Прайста [5].

Бонгерте и др. [4], исследуя уриказу из *B. fastidiosus* методом ЭПР спектроскопии, не обнаружили медь в составе фермента. Однако это не обязательно указывает на отсутствие ее, поскольку известно, что в некоторых случаях в белках содержится ЭПР-недетектируемая медь. Это могут быть одновалентные ионы Cu^+ или диамагнитные димеры двухвалентных ионов $\text{Cu}^{2+}-\text{Cu}^{2+}$ [2]. Те же авторы, применяя атом-

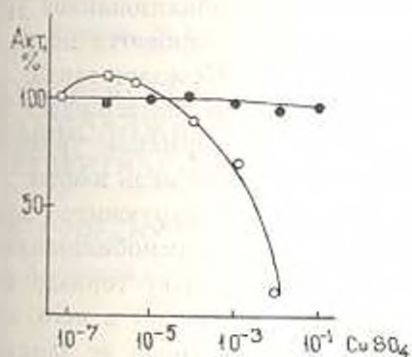


Рис. 4.

Рис. 4. Влияние ионов меди на активность иммобилизованной уриказы. Условия те же, что и на рис. 1. За 100% принята активность фермента в условиях отсутствия ионов меди. О-О-О — нативная уриказа, ●-●-● — иммобилизованная уриказа.

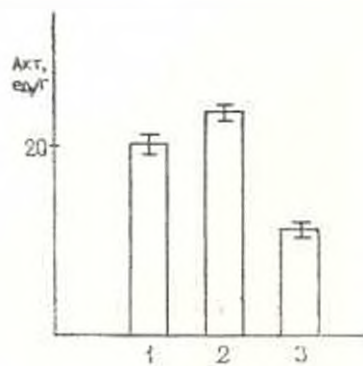


Рис. 5.

Рис. 5. Влияние наличия ионов меди при иммобилизации на активность иммобилизованного препарата. 1 — контроль, 2 — концентрация CuSO_4 при иммобилизации: 2. 10^{-6} M, 3 — $5 \cdot 10^{-3}$ M. Активность препарата измеряли в условиях, указанных на рис. 1. $P < 0.001$.

но-адсорбционную спектроскопию, которая дает возможность обнаруживать и такие ионы меди, выявляя небольшое количество ее, в соотношении с уриказой, равном 1:7, что явно недостаточно для функционирования в качестве кофактора. Кроме того, они сообщают, что ингибирование уриказы цианидом носит обратимый характер — при удалении цианида диализом активность фермента полностью восстанавливается. Этого бы не произошло, если бы инактивация фермента цианидом была связана с удалением меди из активного центра цианидом.

Влияние ионов меди на активность уриказы может быть объяснено взаимодействием этих ионов с регуляторными центрами, приводящими к конформационным изменениям. Последнее отражается на активности фермента. По-видимому, не следует отождествлять эти участки фермента с теми центрами, которые ответственны за регуляцию активности фермента в норме, и тем самым приписывать некую биохимически обусловленную роль ионам меди в уриказном катализе.

Конечно, можно сделать и другое предположение, согласно которому ионы меди входят в состав активного центра, и наблюдаемое нами повышение активности связано с притяжением в активный центр уриказы недостающих ионов меди, которые частично или полностью теряются

при очистке. Однако это кажется маловероятным по следующим соображениям. Во-первых, трудно объяснить работоспособность фермента при практически полном отсутствии ионов меди или таком низком соотношении, какое приводится в работе Бонгерта. Следует также обратить внимание на то обстоятельство, что суммарная активность ферментного препарата при очистке не уменьшается. Во-вторых, предположение о регуляторной роли ионов меди подтверждается также экспериментами с иммобилизованным ферментом. Как известно, при иммобилизации, особенно при ковалентном связывании с матрицей, фиксируется определенное конформационное состояние фермента. На рис. 4 показано влияние ионов меди на активность иммобилизованной уриказы. Как видно, фермент после иммобилизации становится нечувствительным к ионам меди до концентрации 10^{-4} М. Исчезает также активирующее действие низких концентраций Cu^{2+} . Это подтверждает предположение о том, что ионы меди влияют на конформацию уриказы, а не входят в активный центр. Действительно, если медь входит в активный центр, трудно объяснить исчезновение активирующего эффекта. Ведь для внедрения меди в активный центр иммобилизованного фермента нет как стерических ограничений, поскольку гораздо более крупная молекула мочевой кислоты свободно проникает в него, так и электрических, поскольку используемая нами матрица не заряжена. На это указывает то, что рН оптимума действия фермента при иммобилизации не меняется. Кроме того, трудно иначе объяснить исчезновение ингибирующего действия высоких концентраций Cu^{2+} . Другим подтверждением предположения о регуляторном действии ионов меди служит тот факт, что при иммобилизации уриказы в присутствии ионов меди различных концентраций активность иммобилизованного препарата получается различной (рис. 5). При низких концентрациях ($2 \cdot 10^{-6}$ М) активность фермента, измеренная в стандартных условиях, выше активности контрольного препарата. Иммобилизация уриказы в присутствии $5 \cdot 10^{-3}$ М сульфата меди приводит к значительному снижению активности по сравнению с контролем. Можно предположить, что наличие ионов меди в иммобилизационной среде приводит в зависимости от концентрации Cu^{2+} к переходу уриказы в более или менее активную конформацию по сравнению с нативным ферментом. Изменяемая конформация фиксируется при иммобилизации, оставаясь в таком состоянии и после того, как из среды убирается активирующий или ингибирующий фактор.

Таким образом, из вышесказанного следует, что присутствие ионов меди не является необходимым условием для осуществления уриказного катализа; взаимодействуя с уриказой, они приводят к изменению конформации фермента, что отражается на его активности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Метельник Д. Н. Моделирование окислительно-восстановительных ферментов. 148. Минск, 1984.
2. Неорганическая биохимия. 2, 106. М., 1978.
3. Симонов А. Л., Татикян С. Ш., Кулис Ю. Ю. Биохимия. 59, 782, 1985.

4. Bongerts G. P. A., Utzetter J., Brouns R. and Vogel G. D. *Biochem. Biophys. Acta*, 527, 343, 1978.
5. Conley G., Priest D. G. *Biochem. J.*, 187, 733, 1980.
6. Kinsella J. E., German B. and Shetty J. *Comp. Biochem. Physiol.*, 82B, 621, 1985.
7. Mahler H. R., Hybster G., Baum H. J. *Biol. Chem.* 41, 625, 1975.
8. Pitts O. M., Priest D. G. *Arch. Biochem. and Biophys.*, 163, 359, 1974.
9. Robinson P. J., Dunnill P., Lilly M. D. *Biochem. and Biophys. Acta*, 242, 659, 1971.

Поступило 26.VI 1989 г.

Биолог. ж. Армении, № 11.(42).1989

УДК 615.28.615.31

УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ И ГРАМПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ЧЕТВЕРТИЧНОГО АММОНИЕВОГО СОЕДИНЕНИЯ А-660

И. Х. ТОРДЖЯН, Ж. Р. БАБАЯН, К. О. ОВНАНЯН, Г. С. АКОПЯН

Армянский ОТКЗ НИИ эпидемиологии, вирусологии и медицинской паразитологии им. А. Б. Алексаняна, Ереван

В клетках кишечной палочки соединение А-660 вызывает расщепление наружной мембраны клеточной стенки на два электронооптически плотных слоя и нарушение целостности цитоплазматической мембраны. В клетках золотистого стафилококка незначительно разрушается клеточная стенка и разрушается цитоплазматическая мембрана.

Соединение А-660 от известных ПАВ отличается механизмом воздействия на мембраны, приводящим к расщеплению двух ее электронооптически плотных слоев с образованием вздутий.

Աղիքային ցուպիկի բջիջներում Ա-660 միացությունը առաջացնում է բջջապատի արտաքին թաղանթի ճեղքում 2 էլեկտրոնաօպտիկ տեսակետից խիտ շերտերի, ինչպես նաև՝ բակտերիայի ցիտոպլազմատիկ թաղանթի ածրոգրակառուցման խախտում: Ունեկզույն ստաֆիլոկոկի բջիջներում բջջաթաղանթը զուտում է անհշան փրթուն և բաշարվում է ցիտոպլազմատիկ թաղանթի: Ա-660 միացությունը առաքելվում է հայտնի մակերեսային ակտիվ նյութերից երանով, որ երա աղղեցու-թյան մեխանիզմը պայմանավորվում է բջջի թաղանթի 2 էլեկտրոնաօպտիկ խիտ շերտերի քայքայումով, որ առաջացնում է արտափրումներ:

In *Escherichia coli* the combination A-660 evokes splitting of the external membrane of the cell wall into two electrooptically firm layers and breach of continuity of cytoplasmic membrane. In *Staphylococcus aureus* the cell wall is slightly loosened and the cytoplasmic membrane is destructed. The combination A-660 differs from known SAS by the mechanism of influence on the membranes, bringing to the splitting of its two electrooptically firm layers by the formation of swellings.

ПАВ—ультраструктури бактерий—биоциды.

В последние годы ведется интенсивный поиск новых дезинфицирующих средств среди группы катионных ПАВ, в частности, ЧАС

Сокращения. ПАВ—поверхностно-активное вещество; ЧАС—четвертичные аммониевые соединения.