

УДК 577.158

В. Ц. Айказян, Р. М. Налбандян

Ингибирование лакказы Б неорганическими анионами

(Представлено академиком АН Армянской ССР Г. Х. Бунятыном 15/V 1969)

Для выяснения механизма действия ферментов широко используются различные ингибиторы. Ингибирование неорганическими анионами малых размеров, хотя, часто и является неспецифическим, однако, благодаря небольшому размеру, эти ингибиторы достигают участков фермента, труднодоступных для больших ингибирующих молекул. Азид и цианид хорошо известны в качестве ингибиторов гемсодержащих ферментов. В последнее время получены данные, указывающие на то, что эти анионы являются также сильными ингибиторами лакказы и церулоплазмينا—медьсодержащих оксидаз (^{1, 2}). Однако, механизм взаимодействия указанных ингибиторов с медьсодержащими оксидазами подробно не исследовался. Настоящая работа посвящена сравнительному исследованию ингибирования азидом, цианидом и галогенными анионами лакказы (ФК 1. 10. 3. 2 п-дифенол: O₂ оксидоредуктаза) Б из *Coriolus versicolor* (Fr.) Quél.

Лакказу Б из грибов *Coriolus versicolor* получали по методу Фареза и Рейнаммара (³) с некоторыми модификациями: применяемая среда содержала вдвое больше меди (в виде Cu²⁺) и в пять раз меньше железа (Fe³⁺). Во всех опытах количество фермента было одинаковым—2·10⁻⁷ М, концентрация субстрата составляла 10⁻¹ М. В качестве субстрата использовали очищенный возгонкой пирокатехин. Исследования проводили в 0,1 М фосфатном буфере рН 6,0, при 20°C. За ходом реакции наблюдали спектрофотометрически по накоплению продукта (ε_{max} = 410 мкм). Галогиды использовали в виде калиевых солей.

Полученные нами результаты подтверждают высокую ингибирующую способность цианида и азиды. На рис. 1, а и 1, б показаны кинетические кривые накопления продукта в присутствии различных концентраций этих ингибиторов. По мере возрастания концентраций ингибитора, как видно из рисунка, происходит увеличение индукционного периода реакции, однако, конечная (предельная) глубина реакции при этом не изменяется.

Ингибирование галогенидами представляет более сложную картину. На рис. 2, а-г приведены кинетические кривые накопления продукта

для галоидных ионов. Обращает на себя внимание тот факт, что практически полное ингибирование фторидом, наблюдаемое при относительно высоких его концентрациях ($4 \cdot 10^{-4}$ М) не сопровождалось сколько-либо

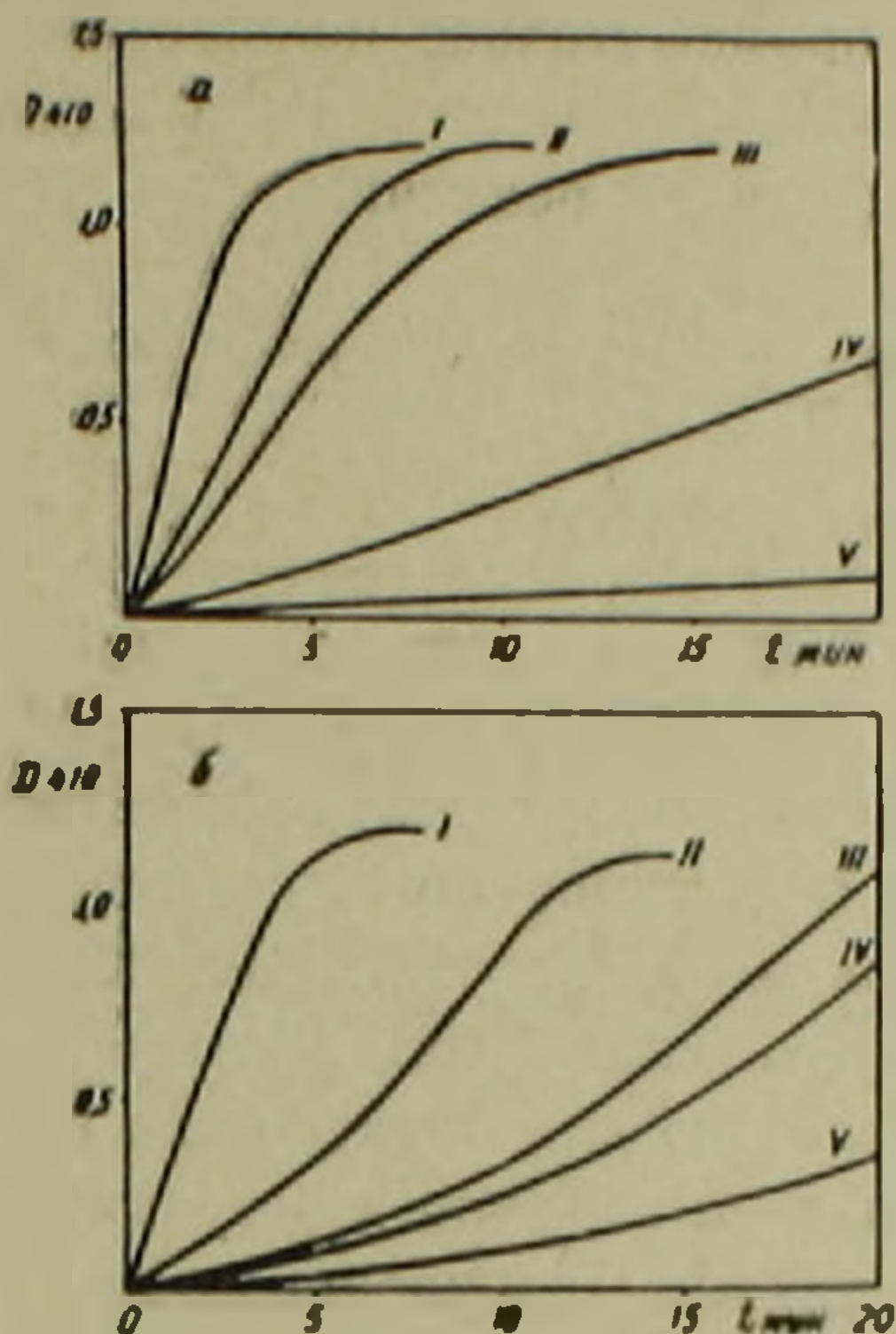


Рис. 1. Ингибирование лакказы следующими концентрациями KCN (а): I—0; II— $6 \cdot 10^{-7}$ М; III— 10^{-6} М; IV— $6 \cdot 10^{-6}$ М; V— $3 \cdot 10^{-5}$ М и NaN_3 . (б): I—0; II— 10^{-7} М; III— $2 \cdot 10^{-7}$ М; IV— $3 \cdot 10^{-7}$ М; V— $5 \cdot 10^{-7}$ М

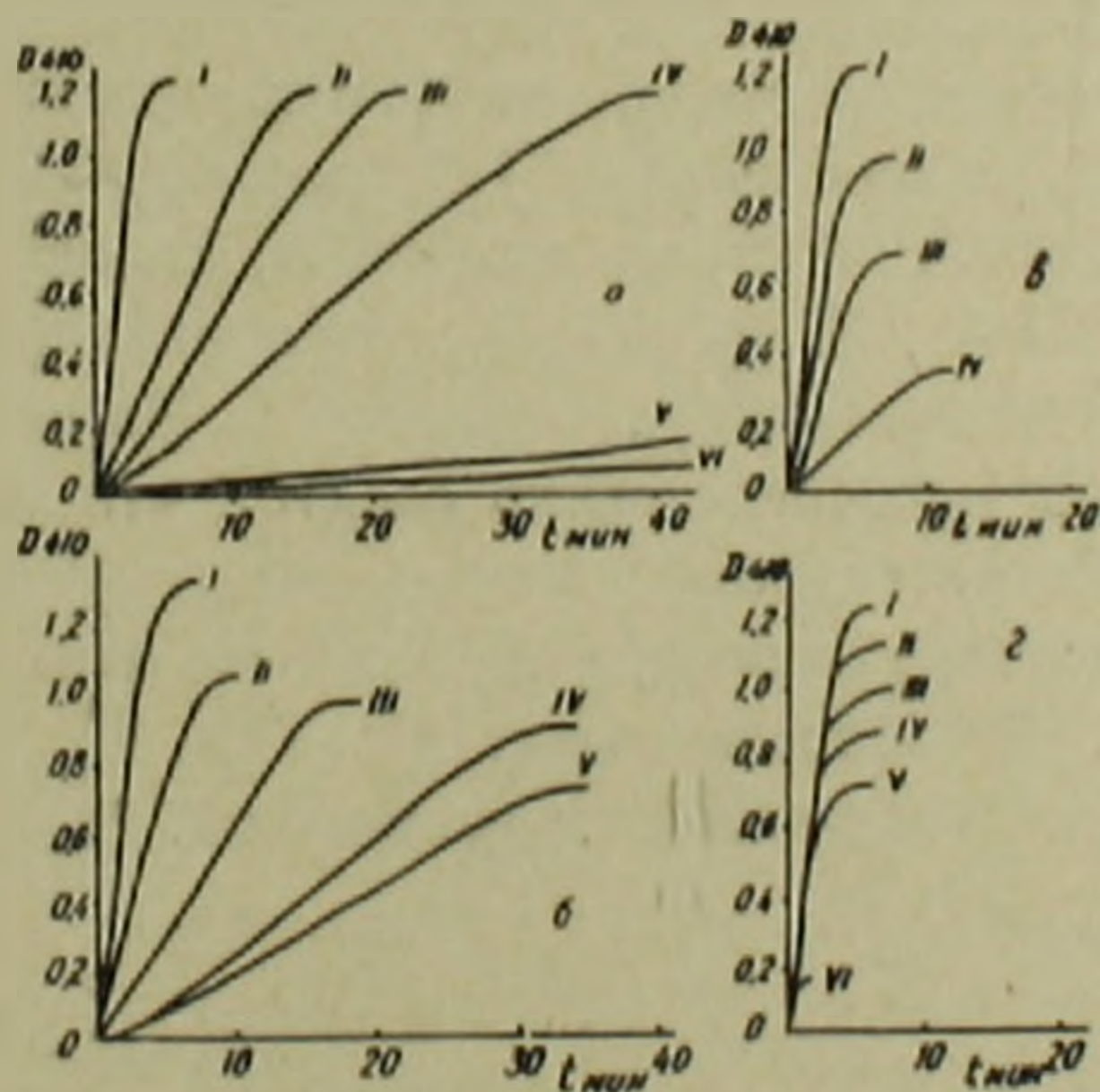


Рис. 2. Ингибирование лакказы ионами фтора (а), хлора (б), брома (в); иода (г). Ингибиторы добавлялись в следующих количествах:

- а: I—0; II— 10^{-5} М; III— $2 \cdot 10^{-5}$ М; IV— $4 \cdot 10^{-5}$ М; V— $4 \cdot 10^{-4}$ М; VI— $4 \cdot 10^{-3}$ М.
б: I—0; II— $2 \cdot 10^{-3}$ М; III— $2 \cdot 10^{-3}$ М; IV— $4 \cdot 10^{-3}$ М; V— $8 \cdot 10^{-3}$ М.
в: I—0; II— $4 \cdot 10^{-3}$ М; III— $8 \cdot 10^{-3}$ М; IV— $2 \cdot 10^{-2}$ М.
г: I—0; II— $2 \cdot 10^{-3}$ М; III— $4 \cdot 10^{-3}$ М; IV— $6 \cdot 10^{-3}$ М; V— $8 \cdot 10^{-3}$ М; VI— $4 \cdot 10^{-2}$ М

значительным изменением предельной глубины реакции, приводя, по существу, лишь к уменьшению скорости реакции. С другой стороны, ин-

гибирование нодидом сопровождалось резким изменением глубины превращения, тогда как различия в скорости реакции в начальный момент для приведенных концентраций ионов нода весьма невелики. Ионы хлора и брома занимают промежуточное положение: по мере увеличения концентрации (в указанном диапазоне) происходило изменение как конечной глубины, так и скорости реакции.

Таблица 1

Ингибирующая способность различных анионов						
Ингибирующая способность	N_3^-	CN^-	F^-	Cl^-	Br^-	I^-
$[I]/[E]$	1	10	10^2	10^4	10^5	10^6

Сравнительное действие исследованных ингибиторов приведено в табл. 1, где рассчитано отнесенное к одной молекуле фермента число молекул ингибитора, приводящее к ~90% ингибированию. Из таблицы видно, что наиболее эффективным ингибитором является азид, одной молекулы которого достаточно для практически полного ингибирования одной молекулы фермента. Аналогичный результат получен для медьсодержащей оксидазы из плазмы—церулоплазмина (4 атома Cu^{2+} и 4 атома Cu^{1+})

Для лакказы, имеющей два атома одновалентной и два атома двухвалентной меди, методом ЭПР было показано, что атомы Cu^{2+} находятся в различных окружениях и имеют различные свойства. Один из атомов двухвалентной меди обуславливает интенсивную синюю окраску белка, обладает меньшей оксидазной активностью и имеет константу сверхтонкого расщепления (СТР), равную ~90 эрстед, тогда как другой атом двухвалентной меди фермента, характеризующийся величиной константы СТР ~170 эрстед, не обуславливает синюю окраску и имеет более высокую оксидазную активность. Из спектров ЭПР ингибированной лакказы непосредственно следует, что цианид, азид и фторид присоединяются ко второму атому меди (1, 2). Присоединение Cl^- , Br^- и I^- происходит, очевидно, по тому же атому меди, и корреляция ингибирующей способности в ряду F^- , Cl^- , Br^- , I^- (см. табл. 1) ионными радиусами представляется возможной.

Институт биохимии
Академии наук Армянской ССР

Վ. Յ. ՀԱՅԿԱԶՅԱՆ, Բ. Մ. ՆԱԼԲԱՆԴՅԱՆ

Լակազայի արգելակումը անօրգանական անիոններով

Ֆերմենտների մեխանիզմը ուսումնասիրելու համար հաճախ օգտագործվում են զանազան արգելակիչներ։ Դրանցից փոքր չափսեր ունեցողները հետաքրքիր են այն բանով, որ նրանք համար հասանելի են ֆերմենտի դժվարամատչելի տեղամասերը։

Ֆլյուի աշխատանքում բերվում են ազիդի, ցիանիդի և հալոիդների անիոններով լակազայի (ՖԿ. 1.10.3.2 պ-դիֆենոլ. O_2 օքսիդոռեդուկտազա) արգելակման համեմատական ուսումնասիրու-

իսկ արդյունքները Յույց է տրված, որ ազիդով ու ցիանիդով արգելակումը ընթանում է բնա-
խան, երբ արգելակիչի կոնցենտրացիայի աճի հետ մեծանում է ինդուկցիոն պարբերությունը,
լալոիդների անիոններով արգելակումը կրում է բարդ բնույթ. հիմն ցիանիդի և ազիդի դեպքում
մակցիայի խորությունը մնում է գրեթե անփոփոխ և մաքսիմալ, հալոիդների դեպքում F^- , Cl^- ,
 Br^- , I^- շարքում արգելակիչի կոնցենտրացիայի աճի հետ զգալիորեն նկատվում է ունակցիայի
խորության մաքսիմումի նվազում:

Արգելակիչների համեմատական ազդեցությունը արտահայտված է հաշվարկված հարաբե-
ական նշանակություններով: Ֆերմենտի մեկ մոլեկուլը մոտավորապես 90%-ով արգելակելու
համար հարկավոր է ազիդի մեկ մոլեկուլ, ցիանիդի՝ 10, ֆտորիդի՝ 10², քլորիդի 10⁴ մոլեկուլ,
լալոիդի և յոդիդի համար դա հավասար է 10⁵ և 10⁶ մոլեկուլի համապատասխանորեն:

Л И Т Е Р А Т У Р А — Դ Ր Ա Կ Ա Ն Ո Ւ Թ Յ ՈՒ Ն

- ¹ B. G. Malmström, B. Reinhammar, T. Vänngård, Blochim. Biophys. Acta, 156
67 (1968). ² R. Malkin, B. G. Malmström, T. Vänngård, FEBS—Letters, 1, 50 (1968).
³ G. Fahraeus, B. Reinhammar, Acta Chem. Scand., 21, 2367 (1967). ⁴ G. Curzon,
J. N. Cumings, Biochemistry of copper. Ed. by J. Pelsach, N. Y.—London, 1966.
⁵ R. Malkin, B. G. Malmström, T. Vänngård, Europ. J. Biochem., 7, 253 (1969).