

Л. Н. ЛОГИНОВА, Н. Е. БОГДАНОВА, С. Л. ЧЕРНИКОВ

К ВОПРОСУ О СООТНОШЕНИИ МОНО-И ДИФЕНОЛОКСИДАЗНОЙ АКТИВНОСТЕЙ *o*-ДИФЕНОЛОКСИДАЗЫ

(Представлено академиком Е. М. Кренсом 24 X 1969)

В настоящее время внимание многих исследователей привлекают альтернативные оксидазы, которые находятся в конкурентных отношениях с цитохромной системой или заменяют ее в ходе онтогенеза. К группе альтернативных оксидаз принадлежит *o*-дифенолоксидаза (1.10.3.1) — фермент, катализирующий две различные по механизму реакции: окисление *o*-дифенолов до *o*-хинонов (дифенолоксидазная активность) и гидроксילирование монофенолов в *o*-дифенолы (монофенолоксидазная активность).

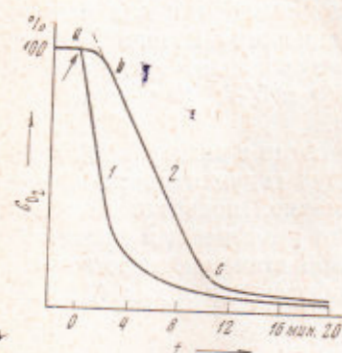


Рис. 1. Измерение дифенолоксидазной (1) и монофенолоксидазной (2) активностей *o*-ДФО. Стрелкой отмечен момент внесения вытяжки в ячейку

Существование оксидаз со смешанными функциями показывает сложность проблемы активации кислорода (1). Катализирование одним ферментным комплексом двух типов реакций — явление редкое в биохимии, поэтому механизм действия этого комплекса и взаимоотношение между двумя активностями заслуживают особого внимания.

Для объяснения механизма окисления монофенолов предложены две гипотезы. Согласно «ферментной» гипотезе, развиваемой Мэзоном (2), *o*-дифенолоксидаза (*o*-ДФО) вводит кислород в молекулу монофенола, причем фермент предварительно должен быть подготовлен, активирован в присутствии *o*-дифенола или другого редуцирующего агента. В соответствии со второй гипотезой (3), монофенол гидроксилируется с помощью *o*-хинона, и *o*-ДФО, таким образом, непосредственно на монофенол не действует.

В серии работ, опубликованных в 1963—1965 гг., Мэзон (4-6) развивает представление о том, что *o*-ДФО построена из субъединиц, находящихся под генетическим контролем. Рекомбинация идентичных субъединиц обуславливает появление различных форм фермента, характеризующихся неодинаковой активностью по отношению к моно- и дифенолам.

Взаимоотношения между моно- и дифенолоксидазной активностями оживленно обсуждаются в литературе, но до сих пор эта интересная проблема остается нерешенной.

Удобным объектом при исследовании особенностей моно- и дифенолоксидазной функции *o*-ДФО является картофель, который обладает весьма высокой монофенолоксидазной активностью, поэтому он использован нами в качестве основного объекта при сравнительном изучении особенностей кинетики моно- и дифенолоксидазной реакций методами полярографии и э. п. р.

Для определения скорости поглощения кислорода при моно- и дифенолоксидазной реакциях применялась полярографическая установка по (7). К 9 г картофеля добавляли 6 мл $1/15$ M фосфатного буфера pH 7,4 и гомогенизировали при 8° в течение 5 мин. в микроизмельчителе тканей РТ-2.

Гомогенат отжимали через два слоя марли и фильтровали при 5° . Опыты проводились через час после начала гомогенизирования, что позволяло окислиться эндогенному субстрату. Как показали контрольные опыты, в течение 2-го часа ни дифенолоксидазная, ни монофенолоксидазная активности *o*-ДФО практически не изменялись. В полярографическую ячейку вносились: 3,7 мл $1/15$ *M* фосфатного буфера pH 7,4; 0,1 мл раствора субстрата (пирокатехин или *n*-крезол; конечные концентрации $1,2 \cdot 10^{-3}$ *M*);

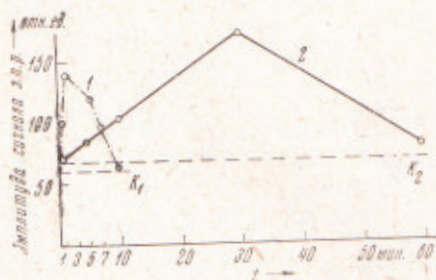


Рис. 2

Рис. 2. Кинетика свободнорадикальных процессов при дифенолоксидазных (1) и монофенолоксидазных (2) реакциях *o*-ДФО (K_1 , K_2 — соответствующие контроли).

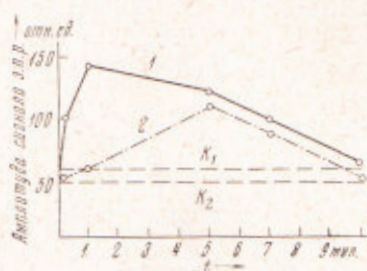


Рис. 3

Рис. 3. Влияние заражения *x*-вирусом картофеля на кинетику свободнорадикальных процессов при дифенолоксидазной реакции. 1 — ткани здорового картофеля (K_1 — контроль); 2 — ткани картофеля, пораженного *x*-вирусом (K_2 — контроль).

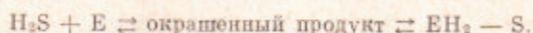
0,2 мл ферментной вытяжки. Опыты проводились при комнатной температуре.

Изучение поглощения кислорода при моно- и дифенолоксидазной реакциях показало, что дифенолоксидазная активность выше монофенолоксидазной в широком диапазоне pH (4,7—8,0). Результаты, представленные на рис. 1, говорят о том, что характер проявления этих двух активностей различен: монофенолоксидазная активность, как правило, появляется с индукционным периодом (участок *ab*). Этот период может быть равен нескольким минутам, и он тем больше, чем ниже скорость окисления монофенола. После индукционного периода процесс становится линейным (участок *bc*). Другие авторы (⁸) отмечали значительно большие фазы запаздывания (20 мин. и более), что, возможно, объясняется иными условиями опыта, в частности применением этими авторами аппарата Варбурга для определения активности *o*-ДФО. Используемый нами полярографический метод позволяет следить за процессом непрерывно и отчетливо показывает изменение активности *o*-ДФО во времени.

Для изучения свободнорадикальных процессов при дифенолоксидазной реакции были использованы модельные системы, в состав которых входили ацетоновые препараты, полученные из тканей картофеля, а также гомогенаты. 50 мг ацетонового препарата или 500 мг ткани клубня растирали в ступке с 1 мл фосфатного буфера pH 7,4 и переносили в колбы для лиофильной сушки. Затем в колбу вводили 0,7 мл 5% пирокатехина (дифенолоксидазная активность) или 0,7 мл 0,08% *n*-крезола (монофенолоксидазная активность). Реакционную смесь фиксировали жидким азотом через 15 сек.; 1; 5; 10 и 30 мин.; через 1 и 24 часа. Контролем служила реакционная смесь, замороженная до внесения последнего компонента реакции. Образцы лиофильно высушивали в течение 8—9 час. и помещали в полиэтиленовые ампулы для снятия спектров э.п.р. Свободные радикалы регистрировали при помощи радиоспектрометра э.п.р. РЭ-1301; записывали первые производные линии поглощения.

В наших экспериментах сигналы э.п.р. представляли собой синглеты. Подобного рода сигналы возникают при образовании комплекса субстрат — фермент. Образование семихинонов сопровождалось появлением

темно-розового окрашивания препаратов. Развитие более интенсивного окрашивания сопровождается уменьшением или исчезновением сигнала э.п.р. Вероятно, указанные изменения окраски связаны с образованием полностью окисленных хинонов, обладающих четным числом электронов и неспособных вызывать э.п.р.-поглощение. Предполагается, что в ходе свободнорадикального процесса при *o*-ДФО реакции субстрат образует с ферментом окрашенный комплекс, подобный так называемому комплексу Михаэлиса (⁹):



Как видно на рис. 2, концентрация свободных радикалов при дифенолоксидазной реакции достигает максимума после минутной экспозиции фермента с субстратом. Затем процесс начинает затухать, и через 10 мин. после начала реакции количество свободных радикалов падает до уровня контроля.

Исследование свободнорадикального состояния при монофенолоксидазной реакции показало (рис. 2), что возрастание концентрации свободных радикалов происходит более интенсивно, чем в ходе дифенолоксидазной реакции. Образование максимального количества свободных радикалов происходит лишь через 30 мин. после начала реакции. Следовательно, и в этом случае характерным для монофенолоксидазной реакции является наличие индукционного периода. Вместе с тем именно при окислении монофенолов наблюдается наиболее высокая амплитуда сигналов э.п.р. Снижение концентрации свободных радикалов происходит постепенно, и даже через час после начала реакции количество свободных радикалов не достигает уровня контроля. Таким образом, кинетика свободнорадикальных процессов при моно- и дифенолоксидазной реакциях имеет различный характер.

При изучении влияния вирусной инфекции (*x*-вирус картофеля) на особенности кинетики свободнорадикальных процессов при *o*-дифенолоксидазной реакции удалось выявить существенные различия между моно- и дифенолоксидазными реакциями: развитие вирусной инфекции привело к снижению интенсивности свободнорадикального процесса в ходе окисления *o*-дифенола (рис. 3), тогда как на монофенолоксидазную реакцию заражение не оказывало заметного влияния: концентрация свободных радикалов в здоровых и зараженных тканях практически одинакова.

Проведенное исследование свидетельствует о том, что моно- и дифенолоксидазная реакции существенно различаются по скорости поглощения кислорода, интенсивности сигнала э.п.р., наличию индукционного периода, длительности свободнорадикального процесса и влиянию вирусной инфекции. Эти различия, вероятно, обусловлены тем, что моно- и дифенолоксидазные функции осуществляются качественно различными субъединицами *o*-ДФО.

Всесоюзный научно-исследовательский
институт защиты растений
Ленинград

Поступило
18 X 1960

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ R. Vercauteren, L. Massart, In: Oxygenases, N. Y., 1962, p. 470. ² H. S. Mason, Nature, 177, 79 (1956). ³ D. Kertesz, R. Zito, In: Oxygenases, N. Y., 1962, p. 307. ⁴ S. Bouchilloux, P. McMahon, H. S. Mason, J. Biol. Chem., 238, 1699 (1963). ⁵ H. S. Mason, Ann. Rev. Biochem., 34, 595 (1965). ⁶ H. S. Mason, R. L. Jolley, J. Biol. Chem., 240, 1489 (1965). ⁷ О. А. Димитров, Вести Ленингр. унив., № 9, сер. биол., в. 2, 79 (1966). ⁸ A. Mayer, J. Friend, J. Exp. Bot., 11, 141 (1960). ⁹ K. Yagi, N. Sugiura et al., Biochim. et biophys. acta, 151, 343 (1968).