Доклады Академии наук СССР
1971. Том 196, № 4

УДК 577.035

БИОФИЗИКА

В. А. КОПЫЛОВ, член-корреспондент АН СССР А. М. КУЗИН

ОБ ИЗМЕНЕНИИ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПОЛИФЕНОЛОКСИДАЗЫ И ЕЕ ИЗОЗИМОВ В γ-ОБЛУЧЕННЫХ РАСТИТЕЛЬНЫХ ТКАНЯХ

В настоящее время все более очевидным становится особая роль ферментных систем в первичных процессах, протекающих в γ-облученном организме ([1–3]). Как известно, одни из них активируются (ДНКаза, фосфорилаза, пероксидаза и пр.), другие ингибируются (окислительное фосфорилирование). Ранее мы высказывали предположение ([4]), что помимо изменения скорости синтеза фермента и его прямой инактивации при облучении могут возникать конформационные изменения его третичной и четвертичной структуры, что и могло бы вести к наблюдаемым изменениям активности фермента в облученной ткани. На примере полифенолоксидазы (ПФО) мы попытались подойти к решению вопроса на уровне изозимов этого фермента. Выбор данного фермента определялся следующими причинами: во-первых, активность его при γ-облучении растений изменяется ([5–7]); во-вторых, что очень существенно, продукты, образующиеся в цепи ферментативного окисления полифенолов ПФО, обладают высокой реакционной способностью и биологической активностью (радиотоксины) ([8]). В литературе нет однозначного суждения о характере повреждения ПФО.

Объектом исследования служили клубни картофеля сорта Лорх в период покоя. Облучали на установке ГУПОС с источником Cs^{137} (мощность 540 р/мин, доза 15 кр). Через 24 часа после облучения выделяли фермент в условиях, предотвращающих окисление субстратов. Весь процесс выделения ПФО происходил при 3—4°. Экстрагировали в растворе фосфатного буфера $5 \cdot 10^{-3}$ *M*, содержащем $5 \cdot 10^{-4}$ мол. цистеина, pH 6,8 в течение 15 мин. Для полноты экстракции осадок дважды обрабатывали вышеуказанным методом. Объединенные экстракты центрифугировали при 10 000 *g* 10 мин. К супернатанту приливали трехкратный объем ацетона, охлажденного до —15°. Выпавший почти белый осадок растворяли в фосфатном буфере pH 6,8. ПФО выделяли методом дробного высаливания сернокислым аммонием. Фракцию 35—65% насыщения ставили на диализ против 0,7% раствора NaCl. Полученный высокоактивный препарат фермента подвергали разделению на Сефадексе Г-100 в градиенте фосфатного буфера от 0,1 до 0,8 *M* Na_2HPO_4.

Фракции, поглощающие в у.-ф. области (регистрацию вели с помощью Увикорда), собирали и определяли их ферментативную активность.

Методы определения активности: 1) по образованию продуктов окисления на СФ-4 в у.-ф. области при λ 326 мμ ([9]); 2) по поглощению кислорода с использованием для этой цели электрода Кларка и полярографа ПА-2 ([10]).

Чистоту фракций, полученных после разделения на Сефадексе Г-100, проверяли методом электрофореза на акриламидном геле по Дейвису ([11]) с некоторыми модификациями ([12]).

Аналогично были получены препараты фермента из необлученных клубней. Результаты опытов по разделению ПФО из нормальных и облученных (15 кр) клубней картофеля на Сефадексе Г-100 приведены на рис. 1. Из него следует, что выделенные препараты ПФО четко разде-

ляются по трем пикам. При определении их полифенолоксидазной активности по поглощению кислорода при помощи электрода Кларка только два (*II* и *III*) способны были окислять хлорогеновую кислоту. Условно обозначим изозим пика *II* как изозим-*I*, а изозим пика *III* как изозим-*II*. Методом электрофореза на акриламиде было также показано, что изолированные препараты ПФО содержат два изозима. В результате γ-облучения клубней картофеля в дозе 15 кр через 24 часа отмечается уменьшение по сравнению с контролем количества изозима-*I* и увеличение изозима-*II*.

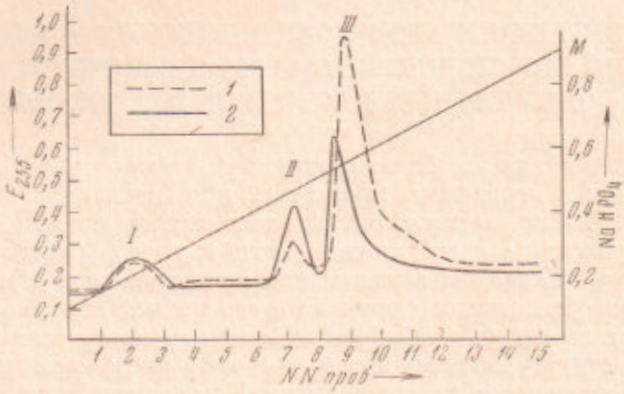

Рис. 1. Разделение препаратов ПФО, выделенных из γ-облученных в дозе 15 кр (*1*) и контрольных (*2*) клубней картофеля на Сефадексе Г-100. *I—III* — фракция, получаемые при элюировании. Отбор проб — по 4,0 мл. Экстинкция регистрировалась на «Увикорде». Градиент $NaHPO_4$

По измерениям на СФ-4 при λ 276 мμ (максимум для ПФО), относительная концентрация белков в пике *II* (изозим-*I*) в норме 1,274, в опыте 0,835. Для пика *III* (изозим-*II*) эти величины соответственно равны 2,750 и 5,140; трехкратная повторность показала, что соотношение величин для изозима-*II* и изозима-*I*, равное в норме 2,16 и в опыте 6,15, сохраняется.

Таким образом, при γ-облучении происходит изменение количественного соотношения изозимов внутри комплекса фермента. Другая особенность действия ионизирующего излучения на ПФО in vivo, как это следует из табл. 1, состоит в том, что спектр специфичности изозимов после облуче-

Таблица 1

Субстратная специфичность изозимов ПФО из клубней картофеля *
(концентрация субстратов $5 \cdot 10^{-4}$ *M*; буфер фосфатный $5 \cdot 10^{-2}$*M*, pH 6,8; 25±0,1°)

Субстрат	Относит. активность, %				Отношение активностей	
	изозим-*I*		изозим-*II*		изозим-*I*	изозим-*II*
	н	о	н	о	о/н	о/н
Хлорогеновая к-та	100	57	100	162	0,57	1,62
Пирокатехин	11	4	52	108	0,36	2,00
Пирогаллол	32	21	37	48	0,65	1,29
Тирозин **	2	0	3	17	0	5,66
Гидрохинон ***	10	35	0	6	3,5	
Бензохинон ***	6	17	0	5	2,8	
Протокатеховая к-та	0	0	Следы			

* н — норма, о — облучение.
** Индукционный период составлял для нормы 30 мин.
*** Исследовано в течение 2 час.

ния шире, чем у аналогичных изозимов в норме. Так изозим-*II* окисляет бензохинон и гидрохинон до «красного» хинона, имеющего максимум поглощения 480 мμ. В норме за тот же промежуток времени ферментативной реакции их образования не отмечено. Значительно возрастает скорость окисления тирозина.

Для наглядности в табл. 1 даны отношения активностей изозимов *I* и *II*, выделенных из γ-облученных клубней картофеля, к их контролям (без облучения). Если в качестве субстрата взят пирокатехин, то отношение для изозима-*I* равно 0,36, для изозима-*II* 2,0; тирозин окисляется изози-

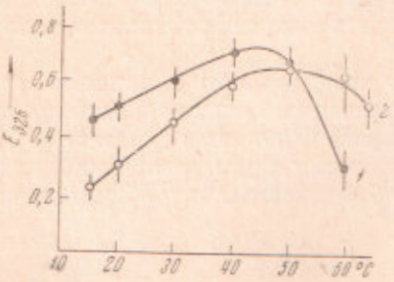

Рис. 2

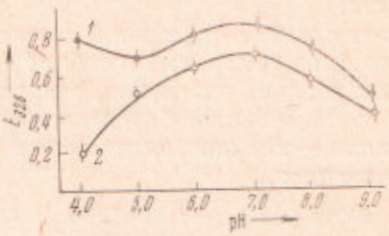

Рис. 3

Рис. 2. Влияние температуры на активность ПФО из клубней картофеля через 24 часа после γ-облучения в дозе 15 кр (*1*) и норме (*2*). Субстрат — пирокатехин $3 \cdot 10^{-4}$ *M*, буфер — фосфатный pH 6,8

Рис. 3. Влияние pH на активность ПФО из клубней картофеля через 24 часа после γ-облучения в дозе 15 кр (*1*) и норме (*2*). Субстрат — пирокатехин $3 \cdot 10^{-4}$ *M*, буфер — фосфатный pH 6,8

мом-*II*, и отношение активностей составляет 5,66; изозим-*I* в результате облучения теряет вообще способность ферментативно расщеплять тирозин.

Результаты этих опытов дают право полагать, что при облучении происходит нарушение сопряженности действия изозимов внутри комплекса ПФО. Возникает вопрос о том, в какой степени отмеченные изменения в изозимном составе отражаются на молекуле фермента ПФО в целом. Можно ожидать конформационных сдвигов в структуре фермента, изменения его стабильности.

Для проверки этого предположения были поставлены специальные опыты, в которых на ПФО воздействовали факторами, оказывающими влияние на геометрию молекул. Об изменении состояния молекул ПФО судили по активности фермента в изучаемых условиях.

На рис. 2 представлены данные о влиянии температуры на активность ПФО, выделенной из γ-облученных и контрольных клубней картофеля. В эксперимент брали равные (по белку) количества изолированных препаратов ПФО. Субстрат — пирокатехин. Из рис. 2 следует, что при низких температурах (14—20°) активность фермента из облученных клубней картофеля выше (примерно в два раза), чем в норме; с повышением температуры эта разница сглаживается, и при 48—55° активность в опыте резко падает, тогда как в норме критический момент наступает при 60—65°.

Большая лабильность ПФО из облученных клубней картофеля могла быть выявлена при действии на последний формамидом натрия. Оказалось, что концентрация порядка 0,001 *M* приводит к необратимой инактивации фермента. В норме, обычно после удаления формамида Na, активность восстанавливается до 80% от исходного.

Другим внешним фактором воздействия на ПФО было изменение концентрации водородных ионов в ферментативной среде. На рис. 3 отражено влияние pH на активность изучаемых ферментов. В области pH 9,0 разница между активностями в норме и после γ-обучения не существенна, в то время как при pH 4,0 в пробах из γ-облученных объектов активность пре-

вышает таковую в норме почти в 4 раза. Результаты этого опыта дают основание считать, что относительное повышение активности ПФО из облученных объектов при pH 4,0 является следствием изменения качественного характера в изозимном составе ПФО, как это и отмечалось выше.

Таким образом, при действии ионизирующего излучения на растительные ткани (в нашем случае клубни картофеля) происходит количественное перераспределение в составе изозимов ПФО, расширение спектра специфичности и изменение активности (вероятно, в силу конформационных изменений молекул) отдельных изозимов.

В норме, как известно, окисление полифенолов ПФО определяется строгой последовательностью и сопряженностью всех звеньев в цепи этого процесса.

Из-за сдвига в изозимном составе и неодинакового изменения активности изозимов (см. рис. 1 и табл. 1) нарушается сопряженность последовательных реакций окисления, что, как ранее было нами показано ([13]), приводит к накоплению биологически активных промежуточных продуктов окисления — хинонов, оксихинонов,— объединяемых под общим названием радиотоксинов.

Институт биологической физики
Академии наук СССР
Пущино-на-Оке

Поступило
30 X 1970

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] А. М. Кузин, Структурно-метаболическая гипотеза в радиобиологии, «Наука», 1970. [2] Е. Ф. Романцов и др., Ранние радиационно-биохимические реакции, М., 1966. [3] Д. Ли, Действие радиации на живые клетки, М., 1963. [4] В. А. Копылов, Сборн. Радиотоксины, их природа и роль в биологическом действии радиации высокой энергии, 1966, стр. 17. [5] А. М. Кузин, В. А. Копылов, Биофизика, 5, 716 (1960). [6] M. Ogawa, I. Uritani, Agr. Biol. Chem., 34, 870 (1970). [7] Б. А. Рубин, Дыхание и его роль в иммунитете растений, Изд. АН СССР, 1960. [8] А. М. Кузин и др., Радиобиология, 1, 659 (1961). [9] A. Sisler, H. I. Evans, Biochim. et biophys. acta, 28, 638 (1958). [10] E. Harel et al., Physiol. Plant, 17, 921 (1964). [11] B. J. Dawis, Ann. N. Y. Acad. Sci., 121, 404 (1964). [12] L. Wright, Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 123, 22 (1966). [13] В. А. Копылов, Природа радиотоксинов и механизм их образования в облученном организме, Кандидатская диссертация, М., 1965.