

К. Б. СЕРЕБРОВСКАЯ, Л. И. АНДРИАДЗЕ

ВЛИЯНИЕ ВОССТАНОВИТЕЛЕЙ И ОКИСЛИТЕЛЕЙ НА АКТИВНОСТЬ АЛЬДОЛАЗЫ

(Представлено академиком А. И. Опарным 28 III 1973)

В течение ряда лет мы изучали влияние системы лецитин — вода на активность ряда ферментов ⁽¹⁾ с целью выяснить с помощью моделирования на липопротеидных коадерватах механизм обратимого действия ферментов, адсорбированных на клеточных структурах.

Гипотеза об обратимости такого рода была выдвинута в нашей стране в 30-х годах ⁽²⁾, а сейчас доказана целым рядом авторов ⁽³⁾.

Электронно-микроскопическое исследование системы лецитин — вода показало, что она представляет собой суспензию липосом ⁽⁴⁾. При изучении

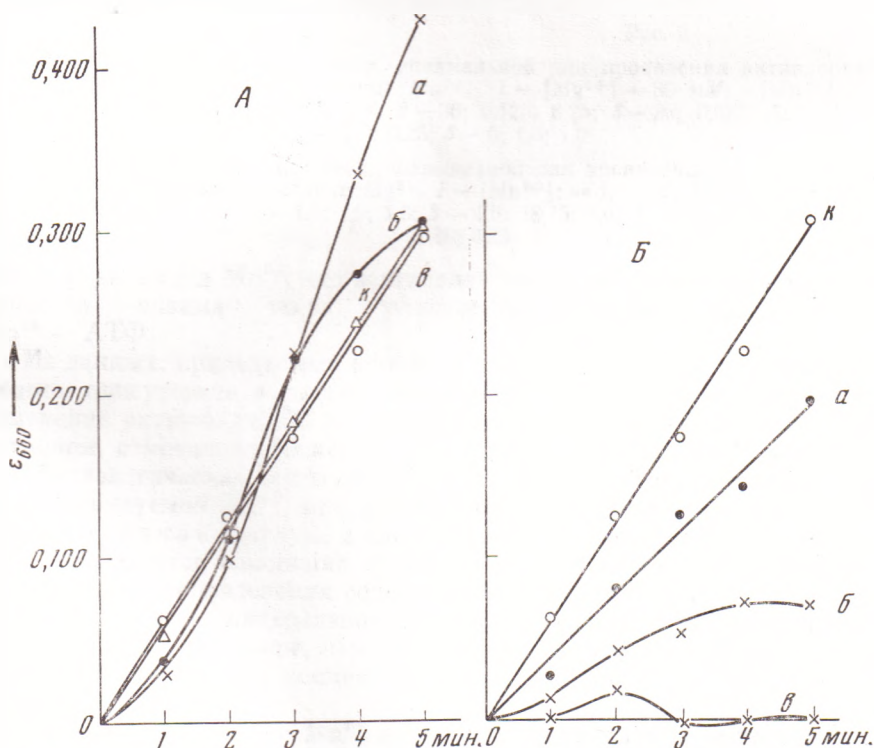


Рис. 1. Влияние различных концентраций гидросульфита натрия (А) и перманганата калия (Б) на активность альдолазы. Эффектор: а — 6 мМ; б — 1,2 мМ; в — 0,6 мМ. ж — контроль, альдолаза

активности ферментов в присутствии таких частиц было обнаружено, что в зависимости от степени окисленности лецитина ^(1, 5) система оказывает различное действие на ферменты. В то время как «молодые» липосомы активируют такие ферменты, как гексокиназу, АТФазу миозина, «старые» не только ингибируют их активность, но и вызывают изменение направления хода реакции.

В предыдущей работе ⁽⁶⁾ нами было показано, что две концентрации детергента — додецилсульфата натрия, которые переводят олигомер альдолазы последовательно в димер и мономер ⁽⁷⁾, имеют характерное воздействие на зависимость хода реакции от времени, весьма напоминающее воздействие окисленного лецитинового золя.

Исходя из этих данных, мы сделали предположение ⁽⁸⁾, что окисленная система лецитин — вода способствует распаду олигомера альдолазы

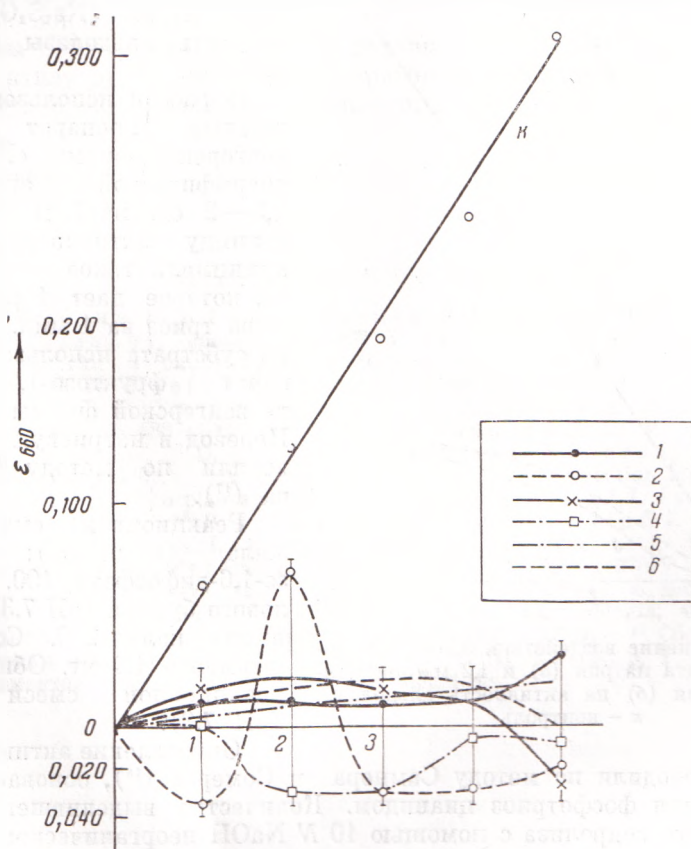


Рис. 2. Характер зависимости активности альдолазы от времени при высокой (6 мМ) концентрации окислителя (перманганата калия) в шести различных опытах (1-6). κ — контроль

на димеры и мономеры. В основе механизма перехода олигомер $\rightleftharpoons$ мономер для изученных нами ферментов может лежать, по нашему мнению, окислительно-восстановительная реакция между белком-ферментом и фосфолипидной молекулой. В ходе такой реакции восстановление фермента сопровождается образованием олигомерной формы, а окисление — мономерной. В качестве донорно-акцепторной системы в нашем случае выступает молекула лецитина: свежий лецитиновый золь («молодые» липосомы) работает как донор, тогда как окисленный золь («старые» липосомы) выступает в качестве акцептора.

Мы предположили далее, что глубокое окисление фермента, переводящее его практически полностью в мономерное состояние, должно сопровождаться появлением у него синтетической активности.

В литературе имеются данные ⁽⁹⁻¹⁴⁾, что ряд ферментов активируется восстановителями и инактивируется окислителями. Это, по мнению авторов, связано с действием этих веществ на сульфгидрильные группы фер-

ментов ⁽¹⁵⁾. Гидролитическая активность таких ферментов, как уреазы, панкреатическая липаза и печеночная эстераза, инактивируется окислителями и активируется восстановителями, а их синтетическая активность, наоборот, активируется окислителями и инактивируется восстановителями ⁽¹⁶⁾.

Исходя из всего вышесказанного, целью данной работы было изучить действие неорганических окислителя — перманганата калия (KMnO_4)

и восстановителя — гидросульфита натрия ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) на активность альдолазы из мышц кролика.

В работе использовали продажный препарат фермента венгерской фирмы «Reanal» со специфической активностью 1,5—2 ед. на 1 мг белка. За единицу активности фермента принимали такое его количество, которое дает 1 $\mu\text{моль}$ фосфора триоз за 1 мин. В качестве субстрата использовали препарат фруктозо-1,6-дифосфата венгерской фирмы «Reanal». Перевод в натриевую соль проводили по методу Селиванова ⁽¹⁷⁾.

Реакционная смесь содержала (в $\mu\text{моль}$): фруктозо-1,6-дифосфата 100, гликолового буфера (рН 7,3) 200, цианида калия 250. Содержание фермента 1,2 мг. Общий объем реакционной смеси 4 мл (рН 7,3).

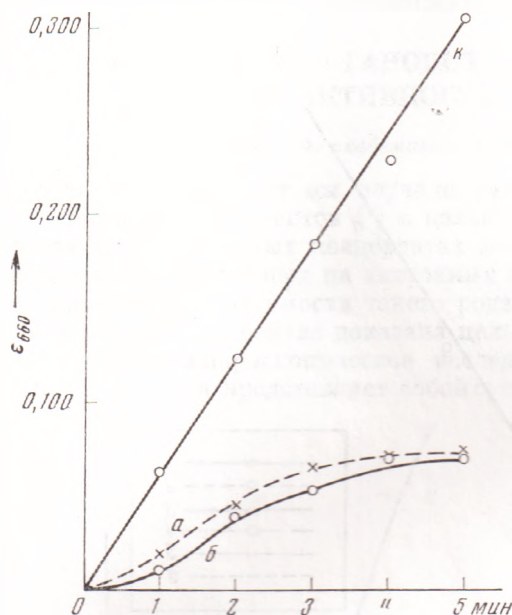


Рис. 3. Сравнение воздействия $3,9 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ додецилсульфата натрия (а) и 1,2 мМ перманганата калия (б) на активность альдолазы. к — контроль

Определение активности альдолазы проводили по методу Самнера и Сомерса ⁽¹⁸⁾, основанному на улавливании фосфотриоз цианидом. Количество выделившегося после 20-минутного гидролиза с помощью 10 N NaOH неорганического фосфора определяли по методу Фиске — Суббароу.

Исходя из данных Лилиуса ⁽¹⁹⁾, мы для выяснения влияния восстановителя (рис. 1А) и окислителя (рис. 1Б) на активность фермента к реакционной среде прибавляли гидросульфит натрия или перманганат калия так, чтобы конечная концентрация эфффектора была 6; 1,2 и 0,6 мМ (рис. 1, а, б, в) соответственно.

Из представленных данных видно, что, в то время как восстановитель оказывает активирующее действие на фермент, окислитель инактивирует альдолазу, причем воздействие обоих эфффекторов коррелирует с их концентрацией.

При высоких концентрациях перманганата калия наблюдается колебание количества измеряемого фосфора триоз около нулевого значения (рис. 2). Эти данные подтверждают наше предположение, что окисление ферментной молекулы до определенного предела может приводить к обращению катализируемой ферментом реакции.

На рис. 3 приводятся данные по влиянию додецилсульфата натрия (а) в концентрации, приводящей к мономеризации альдолазы, и окислителя (б) в концентрации 1,2 мМ. Полная идентичность кривых а и б может свидетельствовать в пользу нашего предположения о диссоциации олигомера фермента в присутствии окислителя. Сходный характер воз-

действия детергента и окислителя позволяет надеяться, что физико-химические методы дадут возможность показать распад альдозазы на субъединицы при воздействии окислителей.

Представленные данные показывают, что действие восстановителя на альдозазу весьма напоминает воздействие «молодых», а окислителя — «старых» липосом на активность ранее изученных нами ферментов ⁽⁸⁾, причем воздействие окислителя очень напоминает по характеру воздействие детергента в той концентрации, при которой происходит распад олигомера на мономеры ⁽⁷⁾.

Авторы приносят сердечную благодарность Е. П. Четвериковой и всему коллективу руководимой ею лаборатории, а также М. Я. Тимофеевой, за большую организационную помощь при проведении указанных экспериментов.

Институт кибернетики
Академии наук ГрузССР
Тбилиси

Поступило
19 III 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. И. Опарин, К. Б. Серебровская, ДАН, 185, 707 (1969). ² А. И. Опарин, А. Л. Курсанов, Biochem. Zs., 239, 1 (1931). ³ В. П. Скулачев, Трансформация энергии в биомембранах, «Наука», 1972. ⁴ К. Б. Серебровская, Я. Кучара, В. И. Штейн-Маргалина, ДАН, 204, 1263 (1972). ⁵ К. Б. Серебровская, Л. З. Гогилашвили, Л. И. Андриадзе, Журн. эволюцион. биохим. и физиол., 5, 583 (1969). ⁶ К. Б. Серебровская, Л. И. Андриадзе, там же, 8, 358 (1972). ⁷ D. Ezra, K. Schachman Howard, Israel J. Chem., 6, Proceeding, 109 (1968). ⁸ K. B. Serebrovskaja, In: Reaction Mechanisms and Control Properties of Phosphotransferase, Leipzig, GDR, 1971. ⁹ J. Janicki, Enzymologia, 7, 182 (1939). ¹⁰ R. Iton, S. Kayashima, T. Fyini, J. Biochem. (Japan), 30, 283 (1939). ¹¹ L. Ledoux, Biochim. et biophys. acta, 13, 121 (1954). ¹² G. Nakagawa, E. Perlman, Federat. Proc., 29, 401 (1970). ¹³ M. Tono, J. Biochem. (Japan), 29, 361 (1939). ¹⁴ J. Sizer, A. Tytell, J. Biol. Chem., 138, 631 (1941). ¹⁵ R. Raumio, Esa-Matti Lilius, Euzymologia, 40, 360 (1971). ¹⁶ Esa-Matti Lilius, Suomen Kemistilehti, 44, 118 (1971). ¹⁷ Сборн. Биохимические методы анализа растений, ИЛ, 1960. ¹⁸ Д. Б. Самнер, Г. Ф. Сомерс, Химия ферментов и методы их исследования, ИЛ, 1948.