

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н.Ореховича

Архив журнала

Вопросы медицинской химии

ISSN 0042-8809

1986

Внимание! Распознавание текста проведено в автоматическом режиме для облегчения работы поисковых систем. Будьте внимательны при копировании, возможны ошибки и неточности. Используйте сканированный графический вариант.

Archive of journal

Voprosy meditsinskoi khimii

ISSN 0042-8809

1986

Attention! OCR has been performed automatically for search engines only. Be careful when copying, errors are possible. Use scanned picture as standard.

<http://pbmc.ibmc.msk.ru>

ТОМ XXXII

ВЫПУСК 2

МАРТ—АПРЕЛЬ

Двухмесячный научно-теоретический журнал

Основан в 1955 г.

ВОПРОСЫ МЕДИЦИНСКОЙ ХИМИИ



МОСКВА · МЕДИЦИНА · 1986

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор С. С. ДЕБОВ

В. И. МАЗУРОВ (зам. главного редактора), Т. Т. БЕРЕЗОВ, Е. Н. ГЕРАСИМОВА,
В. З. ГОРКИН, И. Б. ЗБАРСКИЙ, А. Н. КЛИМОВ, Б. Ф. КОРОВКИН, Л. А. ЛОК-
ШИНА, В. Н. ОРЕХОВИЧ, Л. Ф. ПАНЧЕНКО, М. Ш. ПРОМЫСЛОВ, Е. Л. РО-
ЗЕНФЕЛЬД, Ю. А. РОМАКОВ (ответственный секретарь), В. А. САКС, С. Е. СЕ-
ВЕРИН, В. Б. СПИРИЧЕВ

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

БАЕВ А. А. (Москва)
БЕЛИЦЕР В. А. (Киев)
БЫЧКОВ С. М. (Москва)
КОНСТАНТИНОВ А. А. (Хабаровск)
КУДРЯШОВ Б. А. (Москва)
ЛЯХОВИЧ В. В. (Новосибирск)
ПАСХИНА Т. С. (Москва)

ТРОИЦКИЙ Г. В. (Симферополь)
ТУРАКУЛОВ Я. Х. (Ташкент)
ТЯХЕПЫЛЬД Л. Я. (Тарту)
УТЕВСКИЙ А. М. (Харьков)
ШАПОТ В. С. (Москва)
ЯКОВЛЕВ Н. Н. (Ленинград)
ЯСАЙТИС А. А. (Вильнюс)



Адрес редакции журнала:

Москва, Солянка, 14

АМН СССР

Тел. 297-16-44

Зав. редакцией Л. А. Фирсова

- Structure, Function and Altered Functions. New York, 1979, p. 101—120.
16. Zeller E. A., Birkhauser H. — Schweiz. med. Wschr., 1940, Bd 70, S. 975.

Поступила 25.12.84

OXIDATION OF P-NITROBENZYLAMINE AND P-DIMETHYLAMINOMETHYLBENZYLAMINE CATALYSED BY AMINE OXIDASES FROM HUMAN PLACENTA AND BLOOD SERUM

A. Z. Kirkel, Yu. P. Romanyuk, G. A. Davydova, K. M. Ermolaev, V. A. Pekkel

Institute of Biological and Medical Chemistry, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow, Institute of Pediatrics, Obstetrics and Hereditary Pathologies, Ministry of Public Health of the Ukrainian SSR, Lvov

Oxidation of p-nitro- and p-dimethylaminomethyl derivatives of benzylamine, catalyzed by amine oxidases from human placenta and blood serum, was studied. The amine oxidase activity was estimated by means of a spectrophotometric procedure involving measurement of aldehyde formed during the reaction after extraction with hexane. For extraction of benzaldehyde and p-nitrobenzaldehyde in the samples HCl was added up to the concentration of 0.17 M

and for extraction of p-dimethylaminomethyl benzaldehyde — NaHCO_3 up to the 0.5 M concentration. The reaction products were extracted with a yield of 94 %, 83 % and 78 % respectively; molar extinction coefficients for aldehydes at the maximal absorption were equal to 13,080 (241 nm), 16,520 (258 nm), and 11,547 (248 nm), respectively. Analysis of the oxidative reactions using inhibitors Lilly 51,641, deprenyl, aminoguanidine and semicarbazide showed that monoamine oxidase of the A type (95 %) and benzylamine oxidase (7 %) catalyzed oxidation of 0.1 mM p-nitrobenzylamine in mitochondria and microsomes but oxidation of the substrate at 1 mM concentration was catalyzed by monoamine oxidase of the B type (20 % in mitochondria and 35 % in microsomes). In the soluble fraction oxidation of p-nitrobenzylamine was catalyzed mainly by diamine oxidase (55 %); monoamine oxidase of the A type catalyzed oxidation of 30 % of the amine, benzylamine oxidase — 15 %. The molecular activity of the mitochondrial monoamine oxidase of the A type with p-nitrobenzylamine as a substrate was equal to 61 nmol of the product per 1 mole of the enzyme per 1 min. Since only diamine oxidase catalyzed the p-dimethylaminomethylbenzylamine oxidation in the soluble fraction of placenta this substrate might be used in clinical studies for evaluation of diamine oxidase secretion into blood in pregnancy.

УДК 579.873.21:579.222:577.152.633

Е. В. Шаркова, И. И. Никольская, П. Шомоди,
И. Фельдеш, С. С. Дебов

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЙ НА СТАБИЛЬНОСТЬ ДНК-МЕТИЛАЗ ИЗ КЛЕТОК MYCOBACTERIUM SMEGMATIS BUTYRICUM

НИИ медицинской энзимологии АМН СССР, Москва, Исследовательская группа микробиологии Национального института гигиены, ВНР, Будапешт

Согласно данным литературы, ДНК-метилазы аденина и цитозина, полученные из различных бактериальных источников, характеризуются крайней лабильностью [3, 7, 12, 24, 25]. Вопрос о стабилизации этих ферментов приобретает особую актуальность в связи с возможностью практического использования индивидуальных сайт-специфических ферментов метилирования для изучения первичной структуры ДНК [2, 20]. Одним из подходов к решению этой задачи является подбор различных условий, при которых степень инактивации индивидуальных метилаз минимальна.

Целью настоящей работы было изучение влияния различных факторов на изменение при хранении активности адениновых метилаз из *Mycobacterium smegmatis butyricum*, полученных методом изоэлектрофокусирования (ИЭФ).

Методика

В работе использовали бактериальный штамм *M. sm. butyricum* из музея Исследовательской группы микробиологии Национального института гигиены (Будапешт). Акценторная ДНК тимуса — коммерческий препарат фирмы «Serva» (ФРГ). Донором метильных групп служил меченый S-аденозил-L-метионин ($^3\text{H-SAM}$) с удельной активностью 15 Ки/ммоль фирмы «Amersham» (Англия). Амфолины — фирмы «LKB» (Швеция), глицерин и сахара — фирмы «Serva» (ФРГ). Остальные реактивы — аналитической степени чистоты.

Выращивание клеток *M. sm. butyricum*, получение грубого клеточного экстракта и суммарного белкового препарата, осаждаемого при 0.8 насыщении аммония сульфата (фракция CA), описаны ранее [6, 11].

ИЭФ на амфолинах проводили в градиенте плотности глицерина 0—60 % на колонке объемом 110 мл, используя 1 % раствор амфолинов в диапазоне pH 3.5—10.0 [8]. Фракции метилаз после ИЭФ хранили при -10°C .

К фракциям при хранении добавляли различные компоненты в следующих конечных концентрациях: MgCl_2 и CaCl_2 — $2 \cdot 10^{-3}$ М, сывороточный альбумин — 1 мг/мл, фенил-

метилсульфонилфторид (ФМСФ) — $1 \cdot 10^{-3}$ М, дитиотреитол (ДТТИ) — $5 \cdot 10^{-3}$ М.

Метилазную активность определяли с акцепторной ДНК тимуса и ^3H -SAM в 0,01 М калий-фосфатном буфере pH 7,2. После 3-часовой инкубации при 37°C пробы обрабатывали, как описано ранее [6]. Ферментативную активность измеряли по радиоактивности субстрата в расчете на 100 мкг ДНК и 1 мг белка. Идентификация продуктов метилирования методом хроматографии на бумаге описана ранее [7].

Результаты и обсуждение

Ранее в клетках *M. sm. butyricum* методами ионообменной и аффинной колоночной хроматографии, гель-фильтрации была выявлена гетерогенность метилазного профиля и доказано присутствие нескольких метилаз [12]. Однако индивидуальные ферментные фракции не были получены, одной из причин чего является тот факт, что метилазы из *M. sm. butyricum* чувствительны к нейтральным солям KCl, NaCl и $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, применяемым для элюции. Присутствие в реакционной среде 0,1 М KCl, 0,1 М NaCl и 0,2 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ приводило к ингибированию метилаз фракции СА на 25, 50 и 60 % соответственно. Полученные результаты согласуются с данными литературы о том, что метилазы аденина и цитозина из многих бактериальных источников чувствительны к присутствию нейтральных солей KCl и NaCl в концентрации 0,1–0,2 М [17, 22, 25, 26].

В этой связи методом, наиболее пригодным для фракционирования метилаз из *M. sm. butyricum*, является ИЭФ, которое осуществляется в бессольевой среде. Метод характеризуется высокой разрешающей способностью, эффективностью, воспроизводимостью полученных результатов и обеспечивает концентрирование индивидуального фермента. Показано успешное применение ИЭФ для фракционирования бактериальных ДНК-метилаз из *Shigella sonnei* 47 [8].

Результаты фракционирования ДНК-метилаз из клеток *M. sm. butyricum*, основанного на различиях в изоэлектрических точках (ИЭТ) белков, представлены на рис. 1. Профиль активности суммарного препарата ДНК-метилаз из *M. sm. butyricum* представлен 4 пиками метилазной активности со значениями ИЭТ 4,2, 6,4, 7,2 и 8,3. Для каждого пика определена специфич-

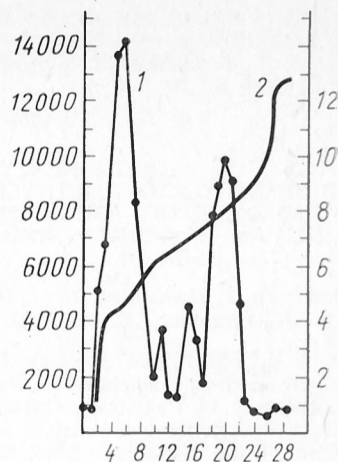


Рис. 1. ИЭФ суммарного препарата метилаз из *M. sm. butyricum* в диапазоне pH 3,0–10,0. По оси абсцисс — номера фракций; по оси ординат: слева — радиоактивность (в имп/мин), справа — значение pH. 1 — активность метилаз; 2 — градиент pH.

ность фермента к азотистому основанию. Показано, что при метилировании акцепторной ДНК при участии фермента из каждого пика в качестве радиоактивного продукта образовался только 6-метиладенин. Проведен анализ каждой метилазы по специфичности к нуклеотидной последовательности с помощью изоэлектричного анализа и последующей экзонуклеазной обработки. Фермент с ИЭТ 4,2 метилирует аденин в последовательности трипуклеотидов 5'...—Г—Г—А...3' и может быть использован в работе для защиты от рестриктаз типа RBamIII и RAvaII на основе частичного совпадения или перекрывания сайтов узнавания [21]. Фермент с ИЭТ 7,2 метилирует аденин в трипуклеотидной последовательности типа 5'...—Пир—А—Пир—...3' и может быть применен для зондирования областей эукариотического и прокариотического геномов, обогащенных последовательностями такого типа [4]. Поэтому в настоящей работе исследования стабильности метилаз при хранении были ориентированы на характеристику этих двух ферментов. В последующем изложении метилазы будут обозначены в соответствии с принятой номенклатурой и значением их ИЭТ: ММбу_{4,2} и ММбу_{7,2}.

Под стабильностью фермента понимают его свойство сохранять каталитическую активность во времени при определенных условиях. Эта физико-химическая характеристика фермента определяется как структурой самого

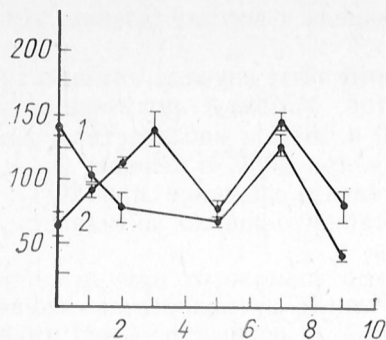


Рис. 2. Активность метилаз при хранении. По оси абсцисс — время хранения (в нед), здесь и на рис. 3: по оси ординат — активность (в % к средней арифметической величине). 1 — ММбу_{4,2}; 2 — ММбу_{7,2}. Каждая точка на кривых 1 и 2 — среднее из данных 5–6 опытов.

фермента, так и его взаимодействием с окружающей средой. Действие стабилизирующих факторов заключается в создании условий, при которых скорость инактивации фермента минимальна и сохраняется устойчивая структура белковой молекулы. В качестве веществ, стабилизирующих структуру фермента, широко применяют растворимые биополимеры, соли двухвалентных металлов и полиолы (глицерин, этиленгликоль, сахароза). Все перечисленные соединения стабилизируют структуру ферментов за счет нековалентных взаимодействий в комплексах между белком и данным веществом. Показано стабилизирующее действие глицерина на ферменты различных классов [10, 15]. Предполагают, что в растворах глицерина происходит частичное разворачивание белковой глобулы, что и стабилизирует нативную глобулярную структуру белка [15]. Индивидуальные метилазы аденина и цитозина из различных бактериальных источников сохраняют активность в 50 % растворе глицерина [7, 14, 22, 24, 25]. Препараты ММбу_{4,2} и ММбу_{7,2}, которые исследовали в настоящей работе, также содержат 35–50 % глицерина. При изучении изменений активности таких ферментных образцов при хранении обращает на себя внимание факт колебания уровня метилазной активности, определяемой через определенные промежутки времени. На рис. 2 приведены типичные кривые, отражающие усредненные результаты изменения активности (выраженной в процентах к средней арифметической величине) в зависимости от сроков хранения. На графиках видно

чередование снижения и повышения активности в течение 2 мес в препаратах ММбу_{4,2} и ММбу_{7,2}. Картина этих колебаний характерна и воспроизводима для препаратов, полученных в разных опытах. В дальнейшем при изучении различных стабилизирующих факторов мы исходили из того, что степень изменения активности в пределах ± 35 –40 % от среднего уровня определяется свойствами самого фермента и не зависит от различного рода воздействий.

По данным литературы, стабилизирующее влияние инертных белков, в частности сывороточного альбумина, на ферменты объясняется как образованием устойчивого комплекса с ферментом, так и свойством альбумина связывать ионы тяжелых металлов [1, 9]. Так, для адениновой метилазы с ИЭТ 5,5–5,7 из *V. sterothermophilus* показано, что альбумин в концентрации 1 мг/мл удлиняет срок хранения без потери активности с 3 нед до 2 лет [17]. Проведенные опыты показали, что в присутствии альбумина активность как суммарного препарата — метилаз из *M. sm. butyricum*, так и индивидуальных фракций изменяется в пределах степени колебания ферментативной активности.

Для стабилизации ферментов часто используют катионы двухвалентных металлов (Ca, Mg, Zn, Co и др.), которые образуют внутримолекулярные комплексы с белками, переводя фермент в стабильную конформацию [9]. Из рис. 3 следует, что изменения ферментативной активности при хранении в присутствии катионов двухвалентных металлов Ca и Mg (на примере пре-

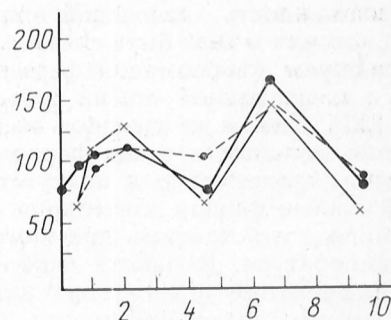


Рис. 3. Активность метилазы ММбу_{7,2} при хранении в присутствии катионов двухвалентных металлов.

Сплошная линия — без катионов; прерывистая линия — в присутствии Mg; линия с крестиками — в присутствии Ca.

парата ММбу_{7,2}) лежат в пределах амплитуды колебаний активности, определяемой без добавок. Аналогичное действие катионов двухвалентных металлов наблюдали в опытах с препаратом ММбу_{4,2}.

При изучении различных стабилизирующих условий были исключены также факторы, при воздействии которых изменение ферментативной активности обусловлено агрегацией белковых молекул в растворе. Степень агрегации зависит от внешних факторов, в частности от значения pH: она существенно уменьшается по мере отклонения pH от ИЭТ белка [5]. Однако сравнение активности ММбу_{4,2}, хранящейся при значении pH, близком к нейтральному [7,2] и соответственно удаленному от значения ИЭТ, с активностью ММбу_{4,2}, хранящейся при значении pH, равном ее ИЭТ (4,2), дало одинаковые результаты в отношении снижения активности за первые 2 нед хранения.

Скорость и степень агрегации зависят от температуры: с понижением температуры уменьшается скорость агрегации белковых молекул и соответственно уменьшается степень инактивации лабильных ферментов при хранении [5]. Так как ММбу_{4,2} и ММбу_{7,2} находились в растворе глицерина, то мы могли хранить препараты при пониженной температуре (—10°C) без дополнительного жесткого воздействия замораживания и последующего оттаивания.

Однако, как показано на рис. 2, хранение при низкой температуре не предотвращало снижение активности метилаз через определенные промежутки времени.

Кроме того, необходимо было исключить возможность холодовой инактивации, которая может быть связана как с изменением конформации фермента, так и с диссоциацией его на субъединицы [23]. Одним из способов восстановления активности таких ферментов являются хранение их в присутствии ДТТИ и последующая длительная преникубация с субстратами при комнатной температуре. В работе использовали ферментные препараты, активность которых была снижена на 50—60 % при хранении как в присутствии ДТТИ, так и без него в течение 2 нед при —10°C. Последующая преникубация таких препаратов с субстратами ДНК или SAM в течение 3 ч при 20°C

не привела к восстановлению активности.

Кроме того, изучали активность препаратов ММбу_{4,2}, полученных ИЭФ при 0 и 16°C и впоследствии хранившихся при 20°C в течение 3—4 нед. Длительное хранение при 20°C тоже не стабилизировало активность фермента.

Среди возможных причин снижения метилазной активности в препарате ММбу_{4,2} за первые 2—4 нед хранения могло быть присутствие протеаз. Однако хранение фермента в присутствии ингибитора протеаз ФМСФ не было эффективно.

Из приведенных результатов следует, что исключение факторов обратимой инактивации ферментов и хранение ММбу_{4,2} и ММбу_{7,2} в условиях, уменьшающих степень агрегации белковых молекул и исключающих возможность холодовой инактивации или в присутствии ингибитора протеолиза ФМСФ, не привели к стабилизации активности.

Хранение препаратов ММбу_{4,2} и ММбу_{7,2} в присутствии веществ, обычно применяемых для стабилизации активности ферментов (сывороточный альбумин, катионы двухвалентных металлов), не изменило картину колебания уровня активности при хранении. Из литературы известно о спонтанных колебаниях ферментативной активности мышечных белков, актомиозина, актина и миозина в водных растворах [13]. Предполагают, что наблюдаемые колебания активности являются отражением конформационных изменений молекул фермента в растворе, заключающихся в изменении вторичной структуры полипептидных цепей. Это приводит к изменению гидрофильно-гидрофобных свойств поверхности белка, что вызывает перестройку структуры воды. В воде распространяется гидрофильно-гидрофобная волна, которая индуцирует колебания отдельных молекул [13].

По мнению ряда авторов, полипептидные цепи молекул метилаз содержат мало упорядоченных областей и много участков в конформации рыхлого статистического клубка [18]. Вследствие этих особенностей вторичная структура метилаз достаточно лабильна и в значительной степени подвержена влиянию различных факторов в растворе [16].

Конформационные колебания активности мышечных белков в водных растворах происходили за короткие периоды времени, равные секундам, что соизмеримо с изменением конформации фермента в акте катализа при образовании и распаде фермент-субстратного комплекса. Изменение метилазной активности мы наблюдали через большие временные интервалы, равные неделям. Медленные изменения метилазной активности согласуются с характером взаимодействия фермента с субстратом, большой молекулой ДНК и с невысокой скоростью реакции метилирования, измеряемой часами *in vitro* в водных растворах при 37 °C.

Принимая во внимание, что колебания активности метилаз заметно превышают разброс результатов, обусловленный методическими причинами, и картина этих колебаний воспроизводима для препаратов в разных опытах и сохраняется при изменении состава среды хранения, полученные результаты можно рассматривать как следствие спонтанных медленных изменений активности метилаз в растворе.

Поскольку аналогичные явления наблюдали и в опытах с отдельными метилазами из клеток *E. coli* СК и *Shigella sonnei* [19], не исключено, что ряд ферментов метилирования следует отнести к группе, для которой практически невозможно подобрать условия стабилизации активности. Если воздействия на такие ферменты и существуют, то они не обнаруживаются за счет того, что амплитуда колебания активности самого фермента достаточно широка и, несомненно, маскирует эффект возможных воздействий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Березин И. Б., Кершенгольц Б. М., Угарова Н. Н. — Докл. АН СССР, 1975, т. 223, № 5, с. 1256.
2. Богдарина И. Г., Бурьянов Я. И., Баев А. А. — Биохимия, 1982, т. 47, № 11, с. 1831.
3. Демидова Г. В., Скопич А. А., Зюзина В. П. и др. — Укр. биохим. журн., 1983, т. 55, № 5, с. 489.
4. Ермекова В. М. — Успехи совр. биол., 1984, т. 98, с. 3.
5. Можаяев В. В., Мартинек К. — Молекул. биол., 1982, № 4, с. 676.
6. Никольская И. И., Ванюшин Б. Ф., Мардашев С. Р. — Биохимия, 1975, т. 40, № 5, с. 1081.

7. Никольская И. И., Александрова С. С., Лопатина Н. А. и др. — Там же, 1977, т. 42, № 4, с. 598.
8. Сучков С. В., Никольская И. И., Дебов С. С. — Вопр. мед. химии, 1983, № 4, с. 117.
9. Угарова Н. Н. — В кн.: Введение в прикладную энзимологию. М., 1982, с. 156.
10. Упорова Т. М., Хилько С. П., Никольская И. И. и др. — Вопр. мед. химии, 1982, № 2, с. 78.
11. Шаркова Е. В., Никольская И. И., Шомоди П. и др. — Там же, № 5, с. 34.
12. Шаркова Е. В., Никольская И. И., Шомоди П. и др. — Там же, 1984, № 5, с. 72.
13. Шноль Г. Э. — В кн.: Молекулярная биофизика. М., 1965, с. 69.
14. Geier G. E., Modrich P. — J. biol. Chem., 1979, vol. 254, p. 1408.
15. Gekko K., Timasheff S. N. — Biochemistry (Wash.), 1981, vol. 20, p. 4677.
16. Green P. I. et al. — J. biol. Chem., 1981, vol. 256, p. 2143.
17. Levy W. P., Welker N. E. — Biochemistry (Wash.), 1981, vol. 20, p. 1120.
18. Newman A. K., Rubin R. A. — J. biol. Chem., 1981, vol. 256, p. 2131.
19. Nikolskaya I. I., Debov S. S. — Physicochem. Biol. Rew., 1984, vol. 4, p. 235.
20. Quint A., Cedar H. — Nucl. Acids Res., 1981, vol. 9, p. 633.
21. Roberts R. J. — Ibid., 1983, vol. 11, p. 135.
22. Sato S., Nakazawa K. — J. Biochem. (Tokyo), 1980, vol. 88, p. 737.
23. Shen W.-Ch., Manck L., Colman R. T. — J. biol. Chem., 1974, vol. 249, p. 7942.
24. Uriell-Shoval S., Gruenbaum Y., Razin A. — J. Bact., 1983, vol. 153, p. 274.
25. Yoo O. J., Agarwal K. L. — J. biol. Chem., 1980, vol. 255, p. 6445.
26. Yoo O. J., Dwyer-Hallquist P., Agarwal K. L. — Nucl. Acids Res., 1982, vol. 10, p. 6511.

Поступила 26.03.85

EFFECT OF VARIOUS CONDITIONS ON STABILITY OF DNA-METHYLASES FROM CELLS OF *MYCOBACTERIUM SMEGMATIS* BUTYRICUM

E. V. Sharkova, I. I. Nikol'skaya,
P. Shomodi, I. Fel'desh, S. S. Debov

Institute of Medical Enzymology, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow, Research Group on Microbiology, National Institute of Hygiene, Budapest

DNA-methylases from *M. sm. butyricum*, produced by means of isoelectrofocusing, were characterized by slow spontaneous variations in the activity with amplitude of 75-80 % under conditions of storage in glycerol at -10°. Effect of various conditions on stabilization of activity of adenine methylases MMbu_{1,2} and MMbu_{7,2} was studied. Alterations in the enzymatic activity were not found in presence of substances applied usually to stabilize the enzymes, blood serum albumin and cations of two valent metals as the values of the alterations occurred in the ranges of the enzyme activity variations.