

Архив журнала

Вопросы медицинской химии

ISSN 0042-8809

1992

Том 38 выпуск 3

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 meditsinskoj khimii

ISSN 0042-8809

1992

Volume 38 issue 3

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>

С. Х. Хадуев, Е. В. Лукашева, В. С. Веса, Т. Ойкава, Н. Есаки, К. Сода, О. Адачи, К. Яги, Т. Т. Березов

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ЛИЗИНОК-СИДАЗЫ ИЗ *TRICHODERMA SP.* И *TRICHODERMA VIRIDE* У 244-2

Университет дружбы народов им. Патриса Лумумбы, Москва, ВНИИ прикладной энзимологии, Вильнюс, Университет, г. Киото, Университет, г. Ямагуси, Институт прикладной биохимии, Митаке, Гифу, Япония

Интерес к ферменту L-лизин- α -оксидазе (ЛО) обусловлен главным образом перспективой его использования в онкологии [1—4] и биосенсорах [5].

В предыдущих экспериментах изучены некоторые физико-химические и биологические свойства ЛО [6, 7, 11, 13]. Учитывая реальную перспективу использования ЛО в народном хозяйстве, представляется оправданным детальное изучение ряда его физико-химических свойств.

Цель настоящей работы — изучение ряда новых физико-химических характеристик различных препаратов ЛО, полученных из разных штаммов-продуцентов независимо в СССР и Японии, для расширения представления о структурных особенностях этого перспективного фермента.

Методика. В работе использовали гомогенный по данному SDS-электрофорезу в ПААГ препарат ЛО из *Trichoderma sp.* (ЛО II) с удельной активностью 29 МЕ/мг, полученный по методу [8], а также ЛО из *Trichoderma viride* Y244-2 (ЛОТ I) с аналогичным значением удельной активности, любезно представленную доктором Н. Kusakabe (Япония). Удельную активность фермента выражали в единицах активности на 1 мг белка. За единицу ферментативной активности принимали количество фермента, катализирующее образование 1 мкмоль перекиси водорода за 1 мин. Активность определяли спектрофотометрически по методу [8].

Содержание Se, Zn, Cu, Fe, Ca, Mn и Mo определяли на атомно-абсорбционном спектрофотометре («Zhimaazu» AA-670G, Япония). Чувствительность прибора 10 нг/мл. Раствор ЛО (30 мкг/мл) анализировался после диализа против 10 мМ трис-НСI-буфера pH 7,4 (1 л ЛО (30 мкг/мл) против 4 смн по 10 л с целью удаления ионов свободных металлов).

Вторичную структуру исследовали методом кругового дихроизма (КД) на спектрополяриметре «Jasco I-600», Япония. Измерения спектров КД проводили при 25 °С в 1 мм кювете. Прибор был прокалиброван (+) — 10 камфорносерной кислотой, $\Delta\epsilon = +2,45 \text{ м}^{-1} \text{ см}^{-1}$ при 290,5 нм. Остаточная эллипсоидность (0) для ЛО II. Спектры КД для ЛО II в концентрации 0,0275 мг/мл и для ЛО I в концентрации 0,0240 мг/мл были сняты при 190—250 нм в атмосфере азота (ферментные растворы были предварительно диализованы против 10 мМ трис-НСI-буфера pH 7,4). Вторичную структуру анализировали по методу [17].

Аминокислотный состав изучали на аминокислотном анализаторе «Beckman 7300» (США). Аминокислотный анализ проводили по методу [16]. Фермент был подвергнут гидролизу в 6 н. НСI при 108 °С в герметичных пробирках в условиях вакуума в течение 3, 6 и 12 ч на «Pico-Tag Work Station, Millipore» (США). Цистин определяли как цистеиноновую кислоту после окисления надмуравьиной кислотой и гидролиза. Триптофан определяли спектрофотометрически по методу [12].

Определение ФАД. Раствор ЛО 0,1 мкмоль в 20 мМ калий-фосфатном буфере pH 7,4 обрабатывали 5 % ТХУ. После precipitation денатурированного белка супернатант анализировали методом ВЭЖХ на колонке «Cosmosil 5C₁₈» (4,6 × 150 мм) фирмы «Toyo-Soda». Элюцию проводили 35 %

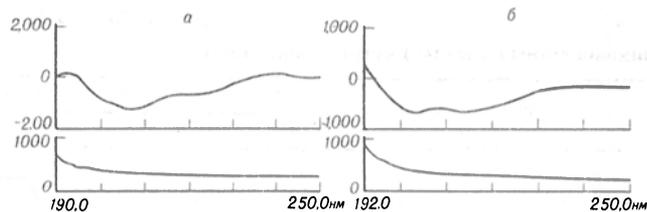


Рис. 1. Спектр КД ЛО из *Trichoderma sp.* (А) и из *Trichoderma viride* Y 244-2 (Б).

10 мМ трис-НСI-буфер pH 7,4; концентрация фермента 0,0275 мг/мл (А) и 10 мМ трис-НСI-буфер pH 7,4; концентрация фермента 0,024 мг/мл (Б).

раствором метанола в 10 мМ NaH_2PO_4 pH 5,5. Скорость элюции 0,8 мл/мин при 23 °С. Площади пиков флуоресценции флавинов записывали и вычисляли на спектрофотометре Zhimadzu Chromatopac C-R2AX.

Измерение флуоресценции в элюатах проводили на спектрофлуориметре Zhimadzu RF-500 SA при 530 нм при возбуждающей длине волны 440 нм. Спектры оптического поглощения записывали на спектрофотометре Zhimadzu 250/OP1-4.

Определение пирролоксинолин хинона (ПХХ) осуществляли после обработки ЛО различными методами.

А. Кислотный гидролиз ЛО осуществляли при концентрации ЛО 12 мг/мл путем гидролиза в 6 н. НСI при 110 °С в течение 72 ч. После удаления НСI в вакууме и нейтрализации гидролизованный раствор пропускали через колонку с сефадексом G-10 (1 × 10 см) с использованием 10 % метанола в качестве элюента.

Б. Тепловую обработку ЛО производили на кипящей бане в течение 10 мин и отделяли супернатант центрифугированием. Окрашенный в ярко-желтый цвет супернатант пропускали через ту же колонку с сефадексом G-10.

Аликвоты (0,2 мл) фракций после процедур А и Б смешивали с аплоглокозодегидрогеназой в присутствии ионов Mg^{2+} в общем объеме 0,5 мл. Инкубацию осуществляли при 25 °С в течение 30 мин. В процессе инкубации апофермент трансформируется в хологлокозодегидрогеназу, если в пробе содержится достаточное для определения количество ПХХ (больше 1 нг/0,2 мл). Образовавшаяся активная глюкозодегидрогеназа катализирует реакцию восстановления красителя 2,6-дихлориндофенола (ДХИФ), в результате чего уменьшается оптическое поглощение при 60 нм. Начальная скорость восстановления ДХИФ пропорциональна концентрации ПХХ [9, 10].

Другие аликвоты фракций после процедур А и Б инкубировали с полученным ферментным препаратом с условным названием ПХХ-освобожденный фермент (ПХХ-оф). После инкубации при 25 °С в течение 2 ч отбирали пробы по 0,2 мл и смешивали с аплоглокозодегидрогеназой, как описано выше.

Результаты и обсуждение. Результаты исследования ЛО I и ЛО II атомно-абсорбционной спектроскопией указывают на отсутствие в структуре фермента тестируемых металлов.

Анализ спектров КД ЛО I и ЛО II (рис. 1) свидетельствует о разной структурной организации двух исследуемых ферментов.

На одну молекулу ЛО II приходится 12 % α -спиралей и 33 % β -форм, в то время как на одну молекулу ЛО I — 13 и 18 % соответственно. Доминирующими остатками аминокислот в обоих ферментах являются аспарагин+аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, аланин и лейцин (табл. 1).

В то же время выявляется значительная разница в содержании глицина, аргинина и триптофана: остатков глицина в ЛО II приблизительно в 2,6 раза больше, чем в ЛО I, а аргинина и триптофана примерно в 4 и 2 раза меньше соответственно.

ЛО II, так же как и ЛО I, характеризуется максимумами оптического поглощения при 275, 385 и 465 нм. Два последних максимума характерны для ферментов, содержащих ФАД. ФАД связан с ферментом весьма прочно, что подтверждается

Таблица 1

Аминокислотный состав L-лизин- α -оксидазы

Аминокислота	Количество остатков аминокислот	
	ЛО II	ЛО I
Аспарагин + аспарагиновая кислота	124	120
Треонин	52	58
Серин	61	52
Глутаминовая кислота	80	90
Глицин	94	36
Аланин	82	76
Валин	36	54
Метионин	26	22
Изолейцин	23	44
Лейцин	79	92
Тирозин	37	56
Фенилаланин	35	42
Гистидин	18	24
Лизин	43	54
Пролин	55	48
Аргинин	8	32
Цистеин	27	14
Триптофан	15	32

Примечание. Среднее значение после 3, 6 и 12 ч гидролиза.

невозможностью отделения ФАД от белковой части в процессе диализа против 2 М КВг по общепринятой методике.

Анализ супернатанта после осаждения белковой части ЛО II 50 % ТХУ методом ВЭЖХ показал, что ЛО II содержит 1 моль ФАД на субъединицу. Возможность отделения ФАД путем обработки ЛО II 5 % ТХУ указывает на нековалентное связывание кофактора с белковой частью фермента. Более высокое оптическое поглощение, наблюдаемое в пике при 385 нм, чем в пике при 465 нм, предполагает возможность существования иной простетической группы, помимо ФАД.

Анализ образцов фермента после обработки по методу А и Б с использованием апоглюкозодегидрогеназы также указывает на наличие в образцах ЛО II кофактора ПХХ (рис. 2 и 3).

Исследование спектров флюоресценции образцов после обработки фермента по методу А и Б показало, что в спектрах возбуждения наблюдает-

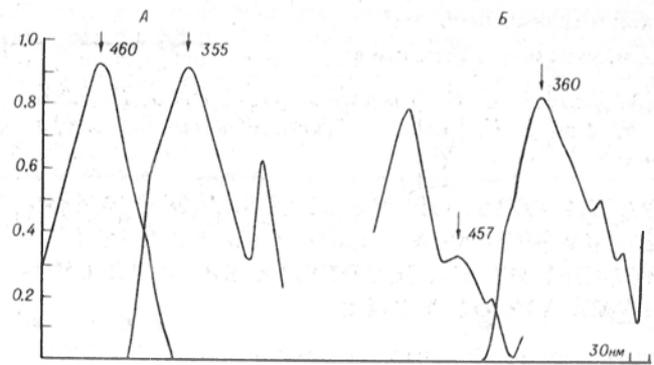


Рис. 4. Спектр флюоресценции ЛО после обработки фермента по методу А (фракция 44) и Б (фракция 84).

По оси абсцисс — длина волны в масштабе: 5 мм — 30 нм.

ся пик при 360 нм, а в спектрах эмиссии — при 460 нм, которые характерны для другого кофактора, в частности ПХХ (рис. 4).

Дополнительная обработка образцов ЛО II ПХХ-оф, предварительно обработанных по методу А и Б, позволяет увеличить возможность определения количества ПХХ. В образце, содержащем 12 мг ЛО II, количество ПХХ, определенное в пике после кислотного гидролиза (метод А), составляло 27,5 и 677 нг, если фракции дополнительно обрабатывали ПХХ-оф. Обработка ЛО II по методу Б и последующая инкубация с ПХХ-оф позволили детектировать 58,4 и 114,8 нг ПХХ на 12 мг ЛО II соответственно. Аналогичная обработка образцов ЛО I не позволяет определять заметные количества ПХХ в молекуле этого фермента. Максимально определяемое количество второго кофактора составляет 0,02 моля ПХХ на молекулу ЛО II.

Полученные результаты позволяют сделать предположение, что наряду с ФАД ЛО из *Trichoderma sp.* содержит ПХХ, поскольку активация апоглюкозодегидрогеназы возможна только при условии ее взаимодействия с ПХХ-содержащим агентом. Одной из причин определяемого низкого содержания ПХХ в ЛО II может являться его чрезвычайно высокая реакционная способность.

Структура ПХХ как нового кофактора была установлена ранее [15]. С тех пор было достоверно показано, что множество дегидрогеназ и оксидаз содержат в своей структуре ПХХ. Ферменты, содержащие ПХХ, были названы хинопротеинами по аналогии с флавопротеинами, к каковым до обнаруженного нами факта относилась и ЛО (табл. 2).

В природе известен только один фермент — нитроалканоксидаза из *Fusarium oxysporum* [14],

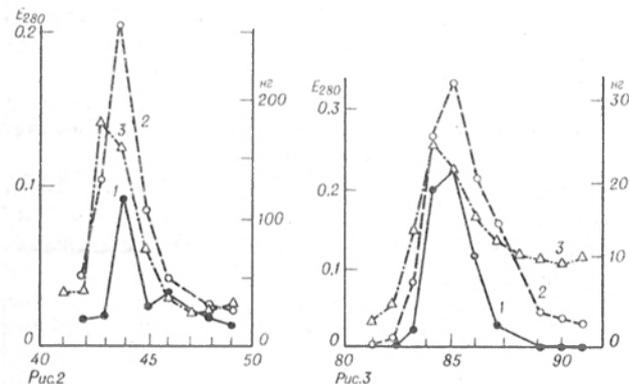


Рис. 2. Определение ПХХ после обработки фермента по методу А и геле-фильтрации.

Здесь и на рис. 3: 1 — фракции, в которых количество ПХХ подсчитывалось с помощью апоглюкозодегидрогеназного метода; 2 — фракции, в которых количество ПХХ (в нг/пробу) подсчитывалось с помощью ПХХ-оф-метода; 3 — оптическая плотность фракций при 280 нм. По оси абсцисс — порядок фракций; объем каждой фракции 2 мл.

Рис. 3. Определение ПХХ после фермента по методу Б и геле-фильтрации. Объем фракции 1,1 мл.

Таблица 2

Хинопротеиновые оксидоредуктазы

Фермент	Организм (штамм)
Метанолдегидрогеназа	Грамм «—» — метилотрофные бактерии
Этанолдегидрогеназа	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Глюкозодегидрогеназа	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>E. coli</i> и др.
Метиламинооксидаза	<i>Arthrobacter P1</i>
Аминооксидаза	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Bovine serum</i> , <i>Porcine kidney</i> и др.
Лизиоксидаза	Планта человека, аорта теленка.

в структуре которого одновременно присутствуют ФАД и ПХХ в качестве кофакторов. Большинство ПХХ-содержащих ферментов в своей структуре содержит медь, что не отмечается в случае ЛО.

Можно заключить, что сравнительное исследование ЛО I и ЛО II обнаружило существенную разницу по ряду тестированных физико-химических характеристик (вторичная структура, аминокислотный и кофакторный состав).

Особый интерес представляет обнаруженное присутствие некоторого количества прочно связанного ПХХ в гомогенных образцах ЛО из *Trichoderma sp.*

По-видимому, именно разницей в физико-химических свойствах ЛО можно объяснить частично и отличия в биологической (а именно в противоопухолевой) активности этих двух ферментов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Березов Т. Т., Хадуев С. Х., Трещалина Е. М. // Проблемы клинической энзимологии. — Ужгород, 1989. — С. 13—14.
2. Березов Т. Т., Хадуев С. Х., Веса В. С. и др. // Объединенный симпозиум биохимических о-в СССР—ГДР, 10-й: Тезисы докладов. — Ташкент, 1989. — С. 12.
3. Березов Т. Т., Хадуев С. Х., Глазкова Т. Ю. и др. // Всесоюзная конф. «Биохимия — медицине»: Тезисы докладов. — Л., 1988. — С. 36—37.
4. Березов Т. Т., Уманский В. Ю., Хадуев С. Х. и др. // Актуальные вопросы в биохимической и иммунологической диагностике злокачественных новообразований. — М., 1989. — С. 106—107.
5. Симонян А. Л., Бадалян И. Э., Хадуев С. Х. и др. Применение лизин- α -оксидазы в проточном ферментном анализаторе «Арфа» ВНИИ Атоминформ, 1989 // Препринт Ереванского физ. ин-та. — 1202(79)—89.
6. Хадуев С. Х., Лукашева Е. В., Смирнова И. П. и др. // Вопр. мед. химии. — 1988. — № 4. — С. 97—100.
7. Хадуев С. Х., Глазкова Т. Ю., Веса В. С. и др. // Бюл. экспер. биол. — 1989. — № 10. — С. 476—477.
8. Хадуев С. Х., Лукашева Е. В., Смирнова И. П., Березов Т. Т. // Вопр. мед. химии. — 1985. — № 5. — С. 130—134.
9. Adachi O., Okamoto K., Shinagawa E. et al. // BioFactors. — 1988. — Vol. 1, N 3. — P. 251—254.
10. Aneyama M., Nonobe M., Shihagawa E. et al. // Analyt. Biochem. — 1985. — Vol. 151. — P. 263—267.
11. Berезov T. T., Khaduev S. Kh., Umansky V. Yu. // FEBS Meeting, 19-th Abstracts. — Rome, 1989. — TH232.
12. Goodwin T. W., Morton R. A. // Biochem. J. — 1946. — Vol. 40. — P. 628—632.
13. Khaduev S. Kh., Vesa V. S., Esaki N. et al. // Jap. Biochem. Soc. Biochemistry (Jap. Ed.). — 1989. — Vol. 61, N 9. — P. 806.
14. Kido T., Soda K. // Seikagaku. — 1984. — Vol. 56. — P. 952.
15. Salisburg S. A., Forrest H. S., Cruse B. T., Kennard O. // Nature. — 1979. — Vol. 280. — P. 843—844.
16. Spackman D. H., Stein W. H., Moore S. // Analyt. Chem. — 1958. — Vol. 30. — P. 1190—1206.
17. Yee Hsing Chen, Jen Tsi Yong, Kue Hong Chan. // Biochemistry (Wash.) — 1974. — Vol. 13, N 16. — P. 3350—3359.

Поступила 09.06.91

COMPARATIVE STUDIES OF SOME PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF L-LYSINE OXIDASE FROM *TRICHODERMA SP* AND *TRICHODERMA VIRIDE* Y244-2

S. Kh. Khaduev, V. S. Vesa, E. V. Lukasheva, T. Oykawa, N. Esaki, K. Soda, O. Adachi, K. Yagi, T. T. Berezov

P. Lumumba People's Friendship University, Moscow, Institute of Applied Enzymology, Vilnius, Kyoto University, Yamaguchi University, Institute of Applied Biochemistry, Mitake, GIFU, Japan

Some physicochemical properties of L-lysine oxidase from two strains of *Trichoderma* were studied. Content of metals and cofactors (Se, Zn, Cu, Fe, Co, Mn, Mo), amino acid analysis, secondary structure were estimated. The enzyme molecule from *Trichoderma sp* was found to contain both FAD and PQQ cofactors.

М. Ф. Гулый, В. Н. Синицкий, Н. А. Стогний, В. В. Сушкова, Н. В. Силонова, Н. Ф. Шевцова, Н. Н. Касьянова

ОСОБЕННОСТИ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ В ПЕЧЕНИ ПРИ МОРФИННОЙ ИНТОКСИКАЦИИ РАЗЛИЧНОЙ ДЛИТЕЛЬНОСТИ

Институт биохимии им. А. В. Палладина АН УССР, Киев

Морфинизм — болезненное пристрастие к употреблению морфина, являющегося алкалоидом опия. Небольшие дозы его вызывают эйфорию и возбуждение, а большие — депрессивное состояние [6]. Единой теории, объясняющей механизм развития физической зависимости, а также абстинентного синдрома, нет. Показано, что в развитии наркотической зависимости большое значение имеет изменение метаболизма белков, нуклеиновых кислот и биогенных аминов [14]. Так, при хроническом введении морфина крысам повышается синтез высокомолекулярных синаптических белков [9]. Введение морфина (130 мг/кг) в течение 4 сут приводит к тому, что синтез растворимых белков в стволе мозга крыс вначале тормозится, а затем усиливается [14]. Добавление же морфина к бесклеточной системе, выделенной из мозга контрольных и хронически получавших морфин мышей, не оказывало влияния на биосинтез белков, но полисомы из мозга мышей, получающих морфин, были более активны по сравнению с контрольными [10]. Предполагают, что морфин может связываться с факторами инициации, аминоксил-тРНК-синтетазами (АРС) или отдельными изоакцепторными тРНК. Эти процессы в печени, где в основном происходит превращение морфина, изучены мало [11].

Целью данной работы явилось изучение влияния морфина на биосинтез белка, а также на процессы гликолиза и цикла трикарбоновых кислот как энергетических источников для метаболических процессов.

Методика. Исследования проведены на 48 белых крысах-самцах линии Вистар массой 160—190 г. Гидрохлорид морфина вводили подкожно животным (1-я группа) в течение 6 дней внутривентриально в виде 1% раствора из расчета 30 мг/кг массы тела; крысы 2-й группы получали морфин в течение 5 нед по схеме, разработанной ранее. Контрольным животным вводили равный объем физиологического раствора.

Содержание глюкозы в крови определяли о-толуидиновым методом, метаболиты гликолиза и цикла трикарбоновых кислот — ферментативными методами [1]. Активность малат- и лактатдегидрогеназы в надосадочной жидкости гомогената печени (после центрифугирования при 105 000 g) определяли, как описано. Из печени животных выделяли суммарные тРНК, используя метод [7], препараты АРС (КФ 6.1.1) выделяли из надосадочной жидкости, полученной после центрифугирования гомогената ткани (90 мин, 105 000 g) с последующей хроматографией на ДЭАЭ-целлюлозе [10]. Белок определяли по Лоури [13].

Для определения уровня аминокислотирования тРНК использовали инкубационную смесь (объем 0,25 мл), содержащую 50 мМ трис-НСl pH 7,5, 4 мМ АТФ, 20 мМ MgCl₂, 5 мМ KCl, 4 мМ дитиотреитол, 0,1—0,2 мМ отдель-