

1. *Nomenclature* committee of the International union of biochemistry (NC-IUB). Nomenclature of iron-sulfur proteins. Recommendation 1978 // *Biochim. et biophys. acta.*— 1979.— **549**, N 1.— P. 105—109.
2. *New perspectives in ferredoxin evolution*/D. G. Geoge, L. T. Hunt, L.-S. L. Yeh, W. C. Barker // *J. Mol. Evol.*— 1985.— **22**, N 1.— P. 20—31.
3. *Beinert H.* Iron-sulfur proteins, the most numerous and diversified component of the mitochondrial electron transport // *Adv. Exp. Med. and Biol.*— 1976.— **74**.— P. 137—149.
4. *Chance B.* Electron transfer: pathways, mechanisms and controls // *Annu. Rev. Biochem.*— 1977.— **46**.— P. 967—980.
5. *Лузиков В. И.* Регуляция формирования митохондрий.— М.: Наука, 1980.— 318 с.
6. *Sequence and organization of the human mitochondrial genome*/S. Anderson, A. T. Bankier, B. C. Barrell et al. // *Nature.*— 1981.— **290**, N 5806.— P. 457—465.
7. *De-Pierre J. W., Ernster L.* Enzymology of intracellular membranes // *Annu. Rev. Biochem.*— 1977.— **46**.— P. 201—262.
8. *Location and nucleotide sequence of the frd B, the gene coding for the iron-sulfur of fumarate reductase of Escherichia coli*/S. T. Cole, T. Grunstrom, B. Jaurin et al. // *Eur. J. Biochem.*— 1982.— **126**, N 1.— P. 211—216.
9. *Nucleotide sequence coding for the respiratory NADH dehydrogenase, UUG initiation codon of Escherichia coli*/I. E. Yong, B. L. Roger, H. D. Campbell et al. // *Ibid.*— 1981.— **116**, N 1.— P. 165—170.
10. *Cole S. T.* Nucleotide sequence coding for the flavoprotein subunit A of the fumarate reductase of *Escherichia coli* // *Ibid.*— 1982.— **122**, N 3.— P. 479—484.
11. *Commak R.* Evolution and diversity in the iron-sulfur proteins // *Chim. scr.*— 1983.— **21**, N 1.— P. 87—95.
12. *Dayhoff M. O., Hunt T. L.* Protein sequence database.— Washington: D. C., 1981.— 265 p.
13. *Dayhoff M. O., Barker W. C., Hunt L. T.* Establishing homologies in protein sequences // *Meth. Enzymol.*— 1983.— **91**.— P. 524—545.
14. *Tedro S. M., Mayer T. E., Kamen M. D.* Primary structure of a high potential iron-sulfur protein from photosynthetic bacterium *Thiocapsa phennigii* // *J. Biol. Chem.*— 1974.— **249**, N 5.— P. 1182—1188.
15. *Fox J. L.* Evolution of flavoproteins // *Flavins and flavoproteins.*— Amsterdam: Elsevier, 1976.— P. 432—436.
16. *Metallothionein: an exceptional metal thiolate protein*/J. H. R. Kagi, J. Kojima, M. N. Kissling, K. Lerch // *Experientia. Sulfur in biology.*— Amsterdam etc., 1980.— **V. 72**.— P. 223—227.

Ин-т биофизики МЗ СССР, Москва

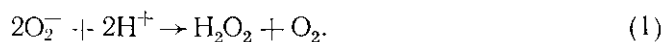
Получено 23.02.87

УДК 588.17

ВЛИЯНИЕ ЦЕРУЛОПЛАЗМИНА, ЛАККАЗЫ И СУПЕРОКСИДИСМУТАЗЫ НА УРОВЕНЬ СУПЕРОКСИДРАДИКАЛОВ

А. Г. Сергеев, А. Р. Павлов, Е. О. Жажина, В. В. Басевич, А. И. Ярополов

Введение. Уровень концентрации супероксидрадикалов (O_2^-) определяет характер протекания многих процессов в организме как в норме, так и при патологии [1, 2]. Согласно современным представлениям, одним из основных ферментов, обладающих антиоксидантными свойствами, является супероксиддисмутаза (СОД, КФ 1.15.1.1), которая катализирует реакцию [3]



Кинетические закономерности протекания реакции (1) в присутствии СОД из различных объектов описаны достаточно полно [4, 5]. Опубликованные в последнее время данные об участии в этой реакции гликопротеидов церулоплазмينا, содержащих медь (ЦП, Fe(II): кислород оксидоредуктаза; КФ 1.16.3.1), и лакказы (ЛК, полифенолоксидаза; КФ 1.14.18.1) указывают на возможность расширения числа ферментов-антиоксидантов [2, 6]. Концентрация ЦП в плазме крови человека достаточно велика ($\sim 0,3$ мг/мл) и зависит от общего состояния организма [7, 8]. Однако до настоящего времени нет единой

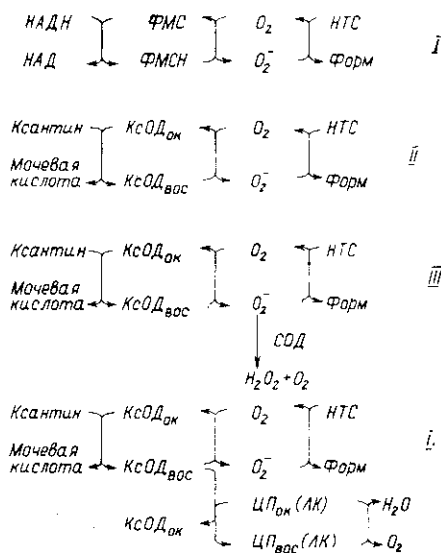
точки зрения об основной физиологической функции ЦП [9, 10]. Это связано с противоречивым характером результатов исследований свойств данного фермента, в том числе его способности изменять концентрацию O_2^- -радикалов [6, 11]. Способность ЛК влиять на уровень O_2^- -радикалов в среде фактически не изучена [2]. В связи с этим в работе рассмотрены процессы, которые протекают *in vitro* в системах генерации O_2^- -радикалов в присутствии ЦП и ЛК, проведено сравнение кинетического описания этих процессов и реакций, катализируемых СОД.

Материалы и методы. В работе использовали ЦП человека, полученный НИИ эксперим. медицины им. Л. Пастера (Ленинград) и охарактеризованный ранее [12], СОД из печени крупного рогатого скота ($A_{260}/A_{680} = 36$, Ин-т биохимии АН АрмССР), ЛК из грибов *Polyporus versicolor* (Арм. филиал ИРЕА) и бычий сывороточный альбумин фирмы «Serva» (ФРГ). Для получения радикалов O_2^- применяли системы ксантин/ксантинооксидаза [13] и НАДН/флавазинметасульфат (ФМС) [14], в которых использовали реагенты производства фирмы «Sigma» (США), «Calbiochem» (США), «Reanal» (ВНР) и «Ega-chimie» (ФРГ) соответственно. Регистрацию O_2^- проводили спектрофотометрически по образованию из нитротетразолиевого синего (НТС) диформаза (Форм), имеющего высокий коэффициент экстинкции при $\lambda = 560$ нм.

Стандартными условиями для получения супероксидрадикала в соответствующих системах являлись $5,9 \cdot 10^{-5}$ М ксантин, $3,5 \cdot 10^{-8}$ М ксантинооксидаза и $2 \cdot 10^{-4}$ М НТС (для ксантин/ксантинооксидазы) и $7,8 \cdot 10^{-5}$ М НАДН, $1 \cdot 10^{-5}$ М ФМС и $2 \cdot 10^{-4}$ М НТС (для НАДН/ФМС). Прямым экспериментом показано, что в области использованных значений концентраций ферментов их влияние на процесс окисления ксантина в системе ксантин/ксантинооксидаза отсутствует.

Изучение кинетики реакции и регистрацию спектров проводили с использованием спектрофотометров «Hitachi-557» (Япония), «Specord M-40» (ГДР) и «ЛКВ» (Швеция). Для приготовления рабочих растворов применяли воду, очищенную на установке «Milli-RO, Milli-Q» фирмы «Millipore» (США). Измерение pH проводили на pH-метре ОР-211/1 фирмы «Radelkis» (ВНР). В работе использовали реактивы марок «хч», «осч». Анаэробные условия создавали продуванием аргоном марки «осч» в течение 30 мин с последующим добавлением $2,3 \cdot 10^{-2}$ М глюкозы, $1,3 \cdot 10^{-6}$ М глюкозооксидазы и $1,3 \cdot 10^{-6}$ М каталазы.

Результаты и обсуждение. Наиболее часто применяемые системы для генерации O_2^- -радикалов содержат НАДН и ФМС или ксантин и ксантинооксидазу. В этих системах образование O_2^- и их регистрация происходит в результате последовательно протекающих окислительно-восстановительных реакций [13, 14] (схема, I и II), приводящих к восстановлению органического красителя до Форм.



Изучение влияния ЦП и ЛК на скорость образования супероксид-радикалов показало, что обе оксидазы подобно СОД подавляли реакцию образования Форм (рис. 1). В качестве контрольной представлена активность бычьего сывороточного альбумина, который не влиял на процесс образования Форм. Интервалы рН, в которых ЦП, ЛК и СОД проявляли данную активность, также совпадают. Сравнение удельных активностей СОД и ЦП обнаружило меньшую (в 50—100 раз) эффективность действия последнего, что хорошо согласуется с результатами

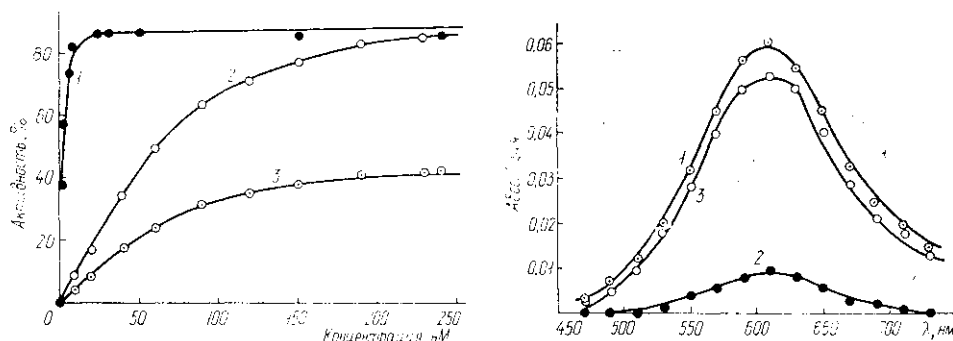


Рис. 1. Зависимость активности СОД (1), ЦП (2) и ЛК (3) от концентрации ферментов в ксантин/ксантиноксидазной системе генерирования супероксидрадикала
Fig. 1. Catalytic activity of SOD (curve 1), CP (curve 2) and LC (curve 3) in the xanthine/XOD O_2^- -generating system. Dependence on enzyme concentration

Рис. 2. Уменьшение поглощения меди первого типа в молекуле ЦП в результате взаимодействия с НАДН в анаэробных условиях: 1 — исходное поглощение меди первого типа; 2 — поглощение после взаимодействия; 3 — после реокисления на воздухе
Fig. 2. Decrease in the first type copper absorbance in CP as a result of interaction with NADH under anaerobic conditions: curve 1 — initial absorption of the first-type copper; curve 2 — absorption after the interaction with NADH; curve 3 — after the reoxidation by oxygen

предыдущих исследований [6]. Эффективность ингибирования у ЛК оказалась в два раза меньше по сравнению с ЦП.

Подобное сравнение изменений, происходящих в O_2^- -генерирующих системах в присутствии ЦП, ЛК и СОД, свидетельствовало об аналогии свойств этих ферментов и было интерпретировано как проявление способности ЦП катализировать реакцию (1). Это служило основанием для использования систем, разработанных для определения активности СОД, в экспериментах по изучению свойств ЦП [6, 14]. Однако представленные на рис. 2 результаты свидетельствуют о восстановлении ЦП НАДН в анаэробных условиях. Процесс восстановления меди первого типа является обратимым, и при переходе от анаэробных условий к аэробным происходит реокисление простетической группы молекулы ЦП. Поэтому подавление ЦП и ЛК образования O_2^- -радикалов в системе НАДН/ФМС/НТС может быть следствием окисления НАДН или ФМСН этими ферментами. Таким образом, использование данной системы для изучения способности ЦП и ЛК влиять на уровень O_2^- -радикалов представляется неоправданным из-за сложности объяснения получаемых результатов.

Сравнение зависимости накопления Форм при окислении ксантина (рис. 3, кривая 1) с зависимостью изменения концентрации мочевой кислоты в ходе реакции (кривая 2) показывает, что реакция восстановления НТС в генерирующей системе обладает заметным лаг-периодом, соответствующим предстационарной фазе накопления супероксид-радикалов. После достижения стационарной концентрации O_2^- скорость восстановления НТС определяется скоростью окисления ксантина, которая зависит только от содержания ксантина и концентрации ксантиноксидазы. Уменьшение концентрации НТС в 2—3 раза не приводило ни к изменению скорости накопления Форм, ни к уменьшению его содержания после завершения реакции. Это свидетельствовало о

том, что вклад реакции спонтанного диспропорционирования в общую скорость процесса превращения супероксидрадикалов чрезвычайно мал и его можно не рассматривать. Конечная концентрация Форм не зависит и от концентрации ксантинооксидазы. При низких концентрациях O_2^- скорости их превращения ферментами в стационарных условиях можно считать пропорциональными концентрации $[O_2^-]$. В таком случае при малой глубине реакции ($\alpha < 0.1$) и избытке ксантина скорости накопления O_2^- и Форм описываются следующими уравнениями:

$$\frac{d[O_2^-]}{dt} = k_{\text{эф}} [KcOД_{\text{вос}}] - k'_{\text{эф}} [НТС]_0 [O_2^-] - k''_{\text{эф}} [E] [O_2^-]; \quad (2)$$

$$\frac{d[\text{Форм}]}{dt} = k'_{\text{эф}} [НТС]_0 [O_2^-], \quad (3)$$

где $k_{\text{эф}}$ и $k'_{\text{эф}}$ — эффективные константы скорости генерации O_2^- и восстановления НТС супероксидрадикалом соответственно; k'' — константа скорости превращения O_2^- исследуемым ферментом; $KcOД_{\text{вос}}$ — восстановленная форма ксантинооксидазы. Интегрирование уравнений (2, 3) приводит к выражению, определяющему величину лаг-периода реакции восстановления НТС:

$$\tau = \frac{1}{k' [НТС]_0 + k''_{\text{эф}} [E]_0}. \quad (4)$$

В присутствии ферментов, обладающих СОД-активностью, лаг-период реакции восстановления НТС должен уменьшаться, так как в знаменателе выражения (4) содержится слагаемое, пропорциональное концентрации фермента. Действительно, оказалось, что в присутствии СОД величина лаг-периода заметно уменьшается (рис. 3, кривые 2 и 3). В отличие от СОД, ЦП и ЛК, ингибируя восстановление НТС в данных условиях, не уменьшали величины лаг-периода (рис. 3, кривая 4). В этом случае логичным представляется вывод о том, что ЦП и ЛК заметно не меняют скорости диспропорционирования O_2^- . Объяснение экспериментально наблюдаемого ингибирующего действия ЦП и ЛК (рис. 1) может быть связано с их влиянием на стадии реакции, предшествующие образованию O_2^- . Можно предположить, что ингибирование образования O_2^- вызвано взаимодействием ЦП и ЛК с ксантинооксидазой. Тогда следовало ожидать, что при взаимодействии ЦП с окисленной формой ксантинооксидазы будет наблюдаться уменьшение скорости превращения ксантина. Однако ингибирования реакции образования мочевой кислоты не было обнаружено даже при концентрации ЦП, достаточной для уменьшения на 70 % скорости восстановления НТС. Это дает основание предположить, что ЦП взаимодействует с восстановленными формами ксантинооксидазы, превращения которых не лимитирует скорость окисления ксантина при $pH < 8,5$ [15].

В самом деле, при $pH = 9,5$, когда скорость превращения ксантина ограничивается скоростью окисления восстановленной формы ксантинооксидазы [15], в присутствии ЦП и ЛК происходит увеличение $V^{\text{эф}}$ реакции окисления ксантина (рис. 4). Это свидетельствует о взаимодействии данных оксидаз с восстановленной формой ксантинооксидазы. Таким образом, полученные результаты указывают на то, что ЦП и ЛК подавляют образование O_2^- , катализируя окисление восстановленных форм ксантинооксидазы.

Следовательно, действие ЦП, ЛК и СОД, формально приводящее к одному и тому же результату — снижению концентрации O_2^- -радикалов, — связано с протеканием принципиально различающихся реакций. Отличие состоит в том, что изменение уровня O_2^- в системе ксантин/ксантинооксидаза/НТС в случае СОД (схема, III) происходит за счет непосредственного катализа реакции диспропорционирования образования O_2^- (1). Действие ЦП и ЛК (схема, IV) является опо-

средованным и связано не с реакцией (1), а с изменением эффективности процессов образования O_2^- .

Представленная схема (III и IV) объясняет отмеченный экспериментальный факт подавления образования H_2O_2 в присутствии ЦП при сравнении с концентрацией H_2O_2 , определяемой в тех же условиях в O_2^- -генерирующих системах, в присутствии СОД [6].

Учитывая необычайно широкую субстратную специфичность ЦП в оксидазных реакциях [1, 2], возможность его электрохимического восстановления [16], наличие прямого взаимодействия с гидратированными электронами и карбоний-ионами [17], можно предположить, что способность ЦП снижать уровень O_2^- определяется ярко выраженными электроноакцепторными свойствами фермента. Вполне вероятно, что при этом не следует принципиально

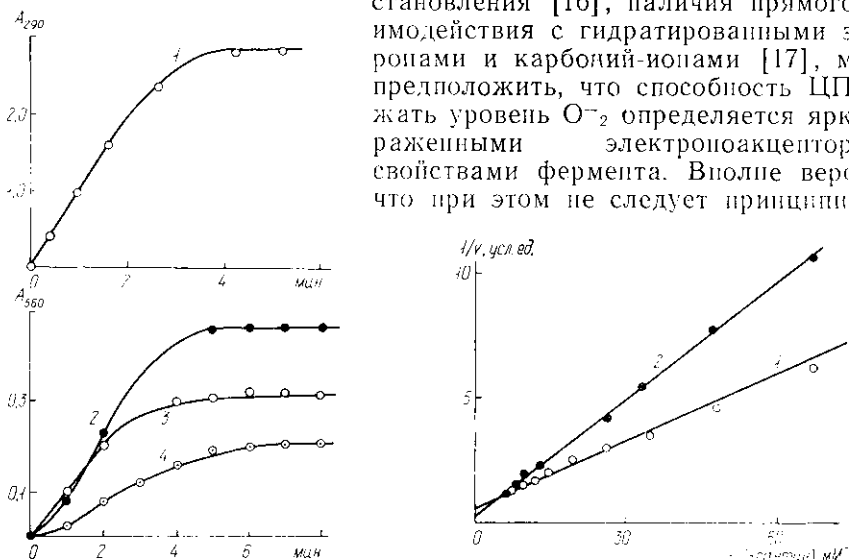


Рис. 3. Накопление мочевой кислоты (1) и Форм (2-4) при окислении ксантина ксантиноксидазой (рН 8,0) в присутствии $3 \cdot 10^{-7}$ М ЦП (4), $9 \cdot 10^{-9}$ М СОД (3) и в их отсутствие (2)

Fig. 3. Accumulation of uric acid (curve 1) and diformazan (curve 2-4) in the course of xanthine oxidation under the action of XOD in the presence of $3 \cdot 10^{-7}$ M CP (curve 4), $9 \cdot 10^{-9}$ M SOD (curve 3) and in their absence (curve 2)

Рис. 4. Зависимость скорости накопления мочевой кислоты от концентрации ксантина при рН 9,5 в координатах Лайнуивера-Берка: 1 — в отсутствие ЦП; 2 — в присутствии $6,4 \cdot 10^{-7}$ М ЦП

Fig. 4. The Lineweaver-Burk plot. Rate of uric acid accumulation in the absence of CP (curve 1) and in the presence of $6,4 \cdot 10^{-7}$ M CP (curve 2), pH 9.5

различать механизмы процессов, лежащих в основе оксидазной активности ЦП, и способности уменьшать концентрацию O_2^- . Таким образом объясняются полифункциональная активность и многообразие свойств, проявляемых ЦП, который можно рассматривать в качестве универсальной оксидазы плазмы крови человека и млекопитающих.

THE INFLUENCE OF CERULOPLASMIN, LACCASE AND SUPEROXIDE DISMUTASE ON THE LEVEL OF SUPEROXIDE RADICALS

A. G. Sergeev, A. R. Pustov, E. O. Zhazhina, V. V. Busevich, A. I. Yaropolov

A. N. Bach Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

Summary

Ceruloplasmin (CP) and laccase were studied for their effect on the xanthine/xanthine oxidase (Xan/XOD) and NADH/phenazine methasulphate (PMS) O_2^- -generating systems. It was shown that the kinetic action of these enzymes differs from that of superoxide dismutase (SOD). While SOD scavenges immediately O_2^- , then CP and laccase react with a predecessor of O_2^- demonstrating clearly their role as electron acceptors. The results indicate that the CP acts as possible universal oxidase of mammalian and human serum.

1. *Loevstad R. A.* Catecholamine stimulation of copper dependent haemolysis: protective action of superoxide dismutase, catalase, hydroxyl radical scavengers and serum proteins (ceruloplasmin, albumin and apotransferrin // *Acta pharmacol. et toxicol.*—1984. — 54, N 5. — P. 340—345.
2. *Ryden L.* Ceruloplasmin // *Copper proteins and copper enzymes.*—Florida: CRC press, 1984. — V. 3. — P. 38—100.
3. *Fridovich I.* Superoxide dismutases // *Adv. Enzymol.*—1974. — 41. — P. 36—97.
4. *Klug D., Rabani J., Fridovich I.* A direct demonstration of the catalytic action of superoxide dismutase through the use of pulse radiolysis // *J. Biol. Chem.*—1972. — 247, N 15. — P. 4839—4842.
5. *Kirby T. W., Fridovich I.* A picomolar spectrophotometric assay for superoxide dismutase // *Anal. Biochem.*—1982. — 127, N 2. — P. 435—440.
6. *Ceruloplasmin: a scavenger of superoxide radical* / G. Goldstein, H. B. Kaplan, H. S. Edelson, G. Weisman // *J. Biol. Chem.*—1979. — 254, N 10. — P. 4040—4045.
7. *Gutteridge J. M. C., Stocks J.* Ceruloplasmin. Physiological and pathological perspectives // *CRC Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*—1981. — 14. — P. 257—330.
8. *Wolf P. L.* Ceruloplasmin: method and clinical use // *Ibid.*—1982. — 17. — P. 229—245.
9. *Friden E.* Ceruloplasmin // *Copper in the environment.*—New York: Wiley, 1979. — Pt 2. — P. 241—276.
10. *Laurie S. H., Mohammed E. S.* Ceruloplasmin: the enigmatic copper protein // *Coord. Chem. Revs.*—1980. — 33, N 3. — P. 279—312.
11. *ESR evidence of superoxide radical dismutation by human ceruloplasmin* / A. Plonka, D. Metodiewa, A. Zgirski et al. // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—1980. — 95, N 3. — P. 978—984.
12. *Кинетическое исследование окислительной реакции церулоплазмина* / Е. Л. Саснко, О. Б. Сиверина, В. В. Басевич, А. И. Ярополов // *Биохимия.*—1986. — 51, № 6. — С. 1017—1021.
13. *McCord I. M., Fridovich I.* Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemocuprein // *J. Biol. Chem.*—1969. — 244, N 22. — P. 6049—6055.
14. *Nishikimi H., Rao N. A., Yagi K.* The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—1972. — 46, N 2. — P. 849—854.
15. *Van Heuvelen A.* Kinetic studies of electron transport reactions at low temperatures in xanthine oxidase // *Ibid.*—1975. — 64, N 3. — P. 963—969.
16. *Гиндилис А. Л., Ярополов А. И., Березин И. В.* Роль механизма действия фермента в проявлении его электрокаталитических свойств // *Докл. АН СССР.*—1987. — 293, № 2. — С. 383—386.
17. *Механизм антиоксидантного действия церулоплазмина* / А. И. Ярополов, А. Г. Сергеев, В. В. Басевич и др. // *Там же.*—1986. — 291, № 1. — С. 237—241.

Ин-т биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, Москва

Получено 24.02.87

УДК 578.22

ЭФФЕКТИВНЫЙ МЕТОД ВКЛЮЧЕНИЯ ДНК В РЕКОНСТРУИРОВАННЫЕ ОБОЛОЧКИ ВИРУСА СЕНДАЙ

**В. В. Власов, Ю. Д. Кренделев, М. Н. Овандер,
А. С. Райт, В. Е. Репин, Ф. П. Свищарчук**

Введение чужеродной ДНК в клетки эукариот и последующее изучение ее экспрессии — один из самых прямых способов исследования функции генетического материала. Однако методы генетической трансформации эукариотических клеток еще далеки от совершенства. Предложенные к настоящему времени способы переноса генов (преципитация с кальций-фосфатом, прямая микроинъекция в ядро клетки, электропорация и некоторые другие) либо чрезмерно трудоемки, либо применимы не ко всем типам клеток [1, 2]. Перспективными выглядят работы по трансформации с помощью плазмид, упакованных в ретровирусподобные частицы. Однако они требуют предварительной работы по созданию соответствующих векторов и их упаковки [3]. Возможно, компромиссным решением может быть использование плазмид, упакованных в вирусные оболочки в системе *in vitro*. Первые опыты в этом направлении уже проделаны [4]. Достигнутая эффективность упаковки пока невелика, соотношение нуклеиновая кислота : белок оболочки в полученных частицах не превосходит 10 % этого соотношения в вирусе [4].