

УДК 547.963.32.

Биохимия

Ж. И. Акопян, Р. Е. Абрамюк

Исследование образования фермент-субстратного комплекса нуклеазы с производными субстрата

(Представлено чл.-корр АН Армянской ССР А. А. Галояном 9/VI 1980)

Представлены результаты исследований взаимодействия нуклеазы с нуклеотидами и их компонентами—ближайшими производными субстратов. Эти соединения обладают способностью взаимодействовать с теми же аминокислотными остатками активного центра молекулы фермента, с которыми взаимодействуют субстраты при образовании фермент-субстратного комплекса, что позволяет получить новую информацию о механизме каталитической реакции (1-3).

Использован гомогенный ферментный препарат, очищенный из отечественного амилоризина ПХ10, полученного из грибов *Aspergillus oryzae* (4). При определении эффективности ассоциации нуклеазы с адениннуклеотидами и их производными УФ-спектры записывали на регистрирующем спектрофотометре «Beckman» (США) шкала длин волн—200—350 нм, скорость регистрации—1000 см⁻¹ за мин. Остаточную активность нуклеазы выражали по формуле $\% = V_1/V_0$, где V_1 —скорость расщепления денатурированной молекулы ДНК нуклеазой, инкубированной с нуклеотидами и их производными, в конечной концентрации $1,5 \times 10^{-5}$ М за t мин, V_0 —скорость расщепления денатурированной молекулы ДНК нуклеазой без предварительной обработки за то же время.

Инкубация препарата нуклеазы с адениновыми нуклеотидами и их компонентами дала возможность обнаружить следующие изменения УФ-спектров от аддитивности: уменьшение поглощения в области 235—270 нм ($-\Delta A_{\text{макс}}$ при 265 нм) и уменьшение в области 270—300 нм ($+\Delta A_{\text{макс}}$ при 285 нм). Подобное отклонение от аддитивности указывает на наличие устойчивой ассоциации между ферментом и субстратом (5).

Эффективность ассоциации нуклеазы с нуклеотидами и составляющими их компонентами коррелирует с составом и строением субстратов. Аденин и аденозин проявляют слабую тенденцию к ассоци-

ции с ферментом, тогда как $5'$ -АМР, $5'$ -АДР и $5'$ -АТР образуют более устойчивый фермент-субстратный комплекс с нуклеазой. Эффективность ассоциации усиливается в ряду: аденин < аденозин < $5'$ -АМР < $3'$ -АМР < $2'$ -АМР < $5'$ -АДР < $5'$ -АТР (рис. 1).

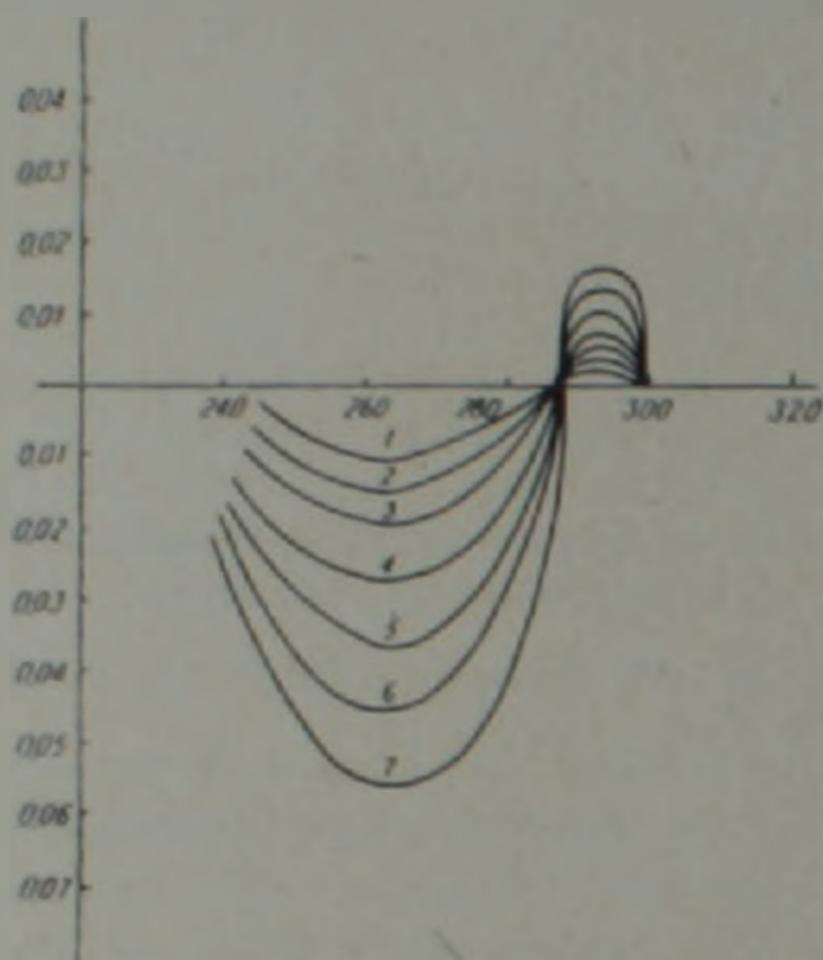


Рис. 1. Отклонение УФ-спектров от аддитивности при внесении фермента в инкубационную среду, содержащую: 1—аденин; 2—аденозин; 3— $5'$ -АМР; 4— $3'$ -АМР; 5— $2'$ -АМР; 6— $5'$ -АДР; 7— $5'$ -АТР. Условия опыта: 0,03М натрий-ацетатный буфер, рН 4,6; конечная концентрация нуклеазы— $1, 2 \times 10^{-5}$ М, конечная концентрация нуклеотидов— $1, 5 \times 10^{-3}$ М. По оси абсцисс—длина волны в нм. По оси ординат изменение оптической плотности (ΔA) раствора

С целью определения молярных соотношений фермента и субстратов проведены исследования с возрастающими концентрациями нуклеотидов. На кривых титрования— ΔA_{265} наблюдаются изгибы, приходящиеся на область молярных соотношений нуклеотид/нуклеата ≈ 1 (рис. 2). Исследован вопрос об участии фосфатов в формировании фермент-субстратного комплекса. Были использованы пуриновые нуклеотиды с нарастающим числом остатков фосфорной кислоты и циклическая форма. Изучение взаимодействия с фосфатами показало отсутствие сколько-нибудь заметного влияния $3'$, $5'$ -АМР на нуклеазную активность, в той же концентрации активность фермента подавлялась на 25% в присутствии $5'$ -АМР, наиболее выраженный ингибирующий эффект отмечался при наличии в среде $5'$ -АТР (рис. 3).

Экспериментальные данные, полученные при исследовании отклонения УФ-спектров от аддитивности, по-видимому, указывают на наличие устойчивой ассоциации между ферментом и субстратом. Эф-

эффективность ассоциации нуклеазы с нуклеотидами и составляющими их компонентами коррелирует с составом и строением субстратов. Наличие зависимости между числом звеньев $(PO_3)^-$, т. е. зарядом

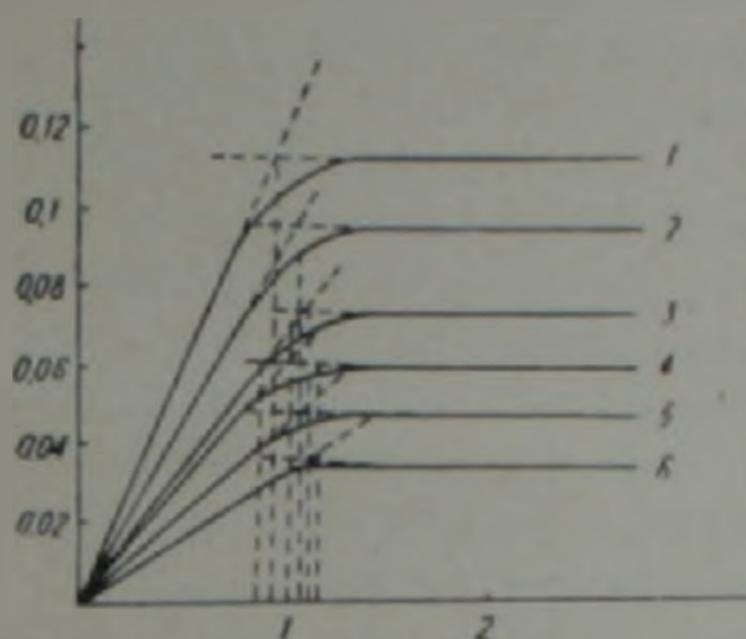


Рис. 2. Зависимость изменения ΔA_{260} от добавления к нуклеазе возрастающих концентраций нуклеотидов. Условия опыта: см. рис. 1. Конечная концентрация фермента $1,8 \times 10^{-4} M$; нуклеотидов $1,5 \times 10^{-4} M$. 1—5'—АТР, 2—5'—АДР, 3—5'—АМР; 4—аденозин; 5—аденин; 6—5'—рибозофосфат. По оси абсцисс—отношение нуклеотид/нуклеаза. По оси ординат—изменение оптической плотности (ΔA) раствора

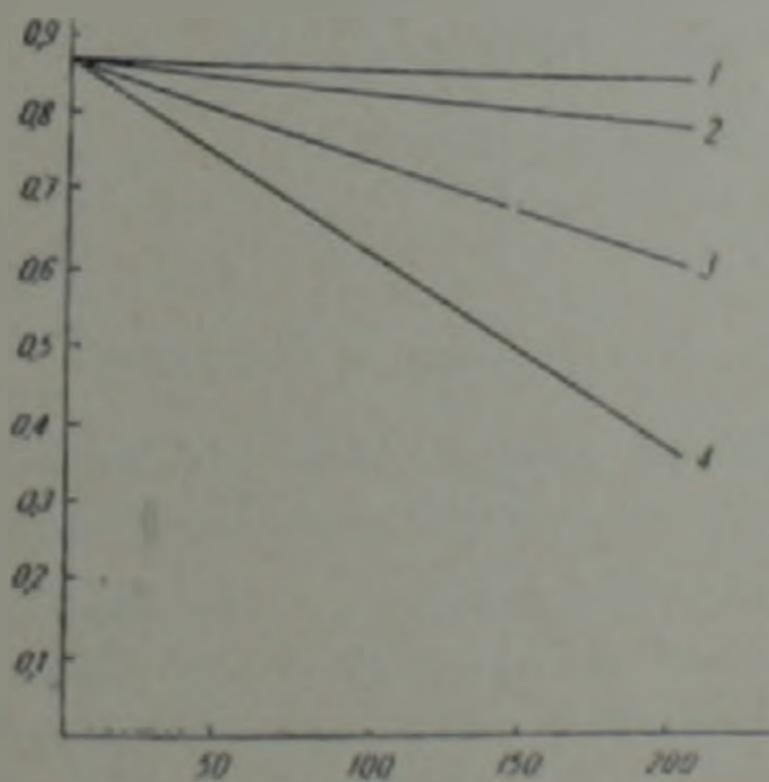


Рис. 3. Влияние структуры нуклеотидов на нуклеазную активность. Условия опыта: см. рис. 1. 1—3', 5'—АМР (циклическая); 2—5'—АМР; 3—5'—АТР. По оси абсцисс—концентрация нуклеотидов. По оси ординат—поглощение при 260 мμ

фосфатного остатка нуклеотида и степенью ассоциации соответствующего соединения с нуклеазой, позволяет сделать допущение о присут-

Л И Т Е Р А Т У Р А — Ц И Т Ы Р Ы В А Н Ы

- ¹ S. Sato, T. Uchida, P. Egami Arch. Biochem and Biophys., vol. 115, 48—52 (1966). ² T. Komiya, M. Irie, J. Biochem., vol. 71, 973—980 (1972). ³ В. И. Крулиничко Г. С., Иванова, Мол., биол., т. 10, 84—88 (1976) ⁴ Р. Е. Абрамов, Х. О. Берджели, Ж. И. Аюлян, Биохимия, т. 44, 990—995 (1979). ⁵ В. И. Крулиничко, Г. С. Казан, С. Г. Иванова, Биохимия, т. 43, 734—739 (1978). ⁶ H. Lineweaver, D. Burk, J. Am. Chem. Soc., vol. 56, 658—664 (1954). ⁷ Н. К. Наградова, Успехи биохимии, т. 9, 95—106 (1968). ⁸ M. Irie, J. Biochem., vol. 65, 133—141 (1969).