

УДК 577.152.3

ИССЛЕДОВАНИЕ СУБСТРАТНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ И КИНЕТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ СУБЪЕДИНИЦЫ НУКЛЕОЗИДТРИФОСФАТАЗЫ ИЗ ПОЧЕК БЫКА

Макарчиков А.Ф., Лукашенко Ю.А., Русина И.М.

УО «Гродненский государственный аграрный университет»

г. Гродно, Республика Беларусь

Нуклеозидтрифосфатаза (НТФаза (КФ 3.6.1.15)) объединяет группу филогенетически не родственных ферментов с широкой субстратной специфичностью, катализирующих реакцию гидролиза нуклеозид-5'-три- (ди-)фосфатов. Ферменты с НТФазной активностью широко распространены в биологических объектах, где участвуют в самых разнообразных аспектах жизнедеятельности, включающих клеточную подвижность, трансмембранный перенос ионов, экспрессию генов, репликацию, рекомбинацию и репарацию ДНК. Известны также НТФазы, которые выполняют специфические функции в отдельных типах клеток и у отдельных организмов.

Ранее в почках быка нами была обнаружена новая растворимая НТФаза. Этот фермент имеет молекулярную массу 146 кДа, рН-оптимум 7,0, абсолютно зависим от катионов двухвалентных металлов и проявляет специфичность к гуанозин-5'-трифосфату (ГТФ), уридин-5'-трифосфату (УТФ) и инозин-5'-трифосфату (ИТФ). НТФаза подчиняется кинетике Михаэлиса-Ментен, при этом значение K_m для ИТФ составляет 0,75 мМ [1]. В результате исследований структурной организации фермента установлено, что он построен из двух субъединиц, одна из которых, обладающая каталитической активностью, представляет собой гомодимер с массой 54-56 кДа [2].

Цель настоящей работы заключалась в изучении субстратной специфичности и кинетических свойств каталитической субъединицы НТФазы.

Ферментативную активность определяли в реакционной смеси объемом 0,5 мл, содержащей 25 мМ трис-25 мМ малеатный буфер, рН 7,0, 0,5 мМ субстрат, 5 мМ $MgCl_2$, 50 мкг альбумина из сыворотки человека и образец фермента. Реакцию проводили 20-60 мин при 37°C, останавливали, добавляя реагент для определения неорганического фосфата (P_i), и измеряли оптическую плотность при 318 нм [3]. Количество образующегося в реакции P_i рассчитывали по калибровочному графику.

Как и нативный фермент, каталитическая субъединица проявляет максимальную активность при pH 7.0 и характеризуется абсолютной зависимостью от двухвалентных катионов, среди которых наиболее эффективны ионы Mg^{2+} . Катионы других двухвалентных металлов обладали менее выраженной активирующей способностью, располагаясь по эффективности в следующий ряд: $Mg^{2+} > Ca^{2+} > Co^{2+}$. Среди тестированных нуклеозид-5'-трифосфатов самым лучшим субстратом каталитической субъединицы НТФазы является ИТФ. Кроме того, каталитическая субъединица с высокой скоростью осуществляет гидролиз УТФ (73% от активности с ИТФ) и ГТФ (61% от активности с ИТФ); небольшая активность также регистрируется с ксантозин-5'-трифосфатом и тимидин-5'-трифосфатом, соответственно 23% и 14% от активности с ИТФ. В то же время аденозин-5'-трифосфат, цитидин-5'-трифосфат, нуклеозид-5'-ди- и монофосфаты не способны служить субстратами.

Кинетические эксперименты показали, что реакция гидролиза ГТФ подчиняется кинетике Михаэлиса-Ментен во всем исследованном диапазоне концентраций субстрата 0,2-2,6 мМ. Значение K_m для ГТФ, рассчитанное по уравнению линейной регрессии графика, составляет 1,03 мМ. В то же время при относительно высоких концентрациях ИТФ ($> 1,8$ мМ) и УТФ ($> 1,0$ мМ) имело место частичное ингибирование ферментативной активности субстратом. В этих случаях для определения величин K_m были использованы линейные участки графиков в координатах Хейнса, расчеты по которым дали следующие результаты: K_m для ИТФ – 2,2 мМ, K_m для УТФ – 0,5 мМ.

Проведенные нами исследования свидетельствуют о некоторых особенностях кинетических свойств каталитической субъединицы НТФазы по сравнению с нативным ферментом. Главным образом, это выражается в характере взаимодействия с субстратом – существенном возрастании K_m для ИТФ. Исходя из полученных данных, можно предположить, что субъединица с молекулярной массой ≈ 90 кДа выполняет в составе фермента регуляторные функции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Makarchikov, A.F. Partial purification and characterization of a soluble nucleoside triphosphatase from bovine kidney / A.F. Makarchikov // J. Biochem. Mol. Biol. Biophys. – 2001. – Vol. 5. – P. 525–531.
2. Макариков А.Ф. Выделение каталитической субъединицы нуклеозидтрифосфатазы из почек быка / А.Ф. Макариков, Ю.А. Лукашенко // Современные технологии с-х. производства: материалы XIII Междунар. науч.-практ. конф. – Гродно, 2010. – Т. 2. – С.207–208.
3. Sapry, M.K. A single reagent method of phosphate estimation in phosphatase(s) assay / M.K. Sapry, H. Geetha, T.K. Shetty // Ind. J. Biochem. Biophys. – 1987. – Vol. 24. – P. 340–343.