

Г. А. ПАНОСЯН

К ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ИЗОТОПНОГО МЕТОДА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СТРУКТУРЫ ФЕРМЕНТА, АКТИВИРУЮЩЕГО АМИНОКИСЛОТЫ

Как известно [1—3, 6, 7], передача генетической информации (нуклеотидной последовательности) от одной молекулы нуклеиновой кислоты к другой осуществляется при помощи механизма комплементарности: от ДНК к информационной РНК (и-РНК) и от и-РНК к антикодону соответствующей транспортной РНК (т-РНК); роль РНК рибосом (р-РНК) и взаимоотношение и-РНК и т-РНК в настоящее время пока неизвестны.

Связь между аминокислотой и и-РНК осуществляет другая РНК—т-РНК, которая одним своим концом соединяется с аминокислотой, а другим участком (антикодоном) комплементарно связывается с соответствующим участком и-РНК (кодоном). Поскольку в настоящее время известно, что в клетке существует, по крайней мере, столько т-РНК, сколько имеется природных аминокислот, и что каждая аминокислота специфически соединяется с определенной т-РНК, то ясно, что именно взаимодействие (комплементарное) кодона с антикодоном приводит к синтезу полипептидной цепочки с аминокислотной последовательностью, определяемой последовательностью нуклеотидов в молекуле РНК или ДНК.

Известно, что специфическое взаимодействие фермента со своим субстратом обусловлено стерическими особенностями полипептидной цепочки и наличием соответствующего активного участка в молекуле фермента. Активирование аминокислот ферментом активации осуществляется строго специфическим ферментом: для каждой аминокислоты существует свой фермент активации. При активировании аминокислоты последняя присоединяется к АТФ с отщеплением пирофосфата в присутствии фермента. На этом этапе специфичность фермента обуславливается теми же закономерностями, которые лежат в основе других ферментативных реакций.

Совершенно иного рода специфичность мы имеем при присоединении аминокислоты к т-РНК. В этом случае комплекс белковой молекулы с АМФ и аминокислотой каким-то еще не известным способом «узнает» молекулу соответствующей т-РНК. Каким образом происходит это «узнавание»?

Можно предположить три возможных механизма:

1. Специфичность обусловлена каким-то структурным «соответствием» белковой молекулы фермента и т-РНК. В настоящее время говорить о подобном структурном соответствии молекулярной организации белка и нуклеиновых кислот не приходится.

2. Специфичность обусловлена активированной аминокислотой. От подобного механизма необходимо отказаться по следующим соображениям: если бы специфичность взаимодействия аминокислоты с т-РНК обуславливалась аминокислотой, то либо реакция присоединения к т-РНК происходила бы и в отсутствие фермента, либо в этой реакции участвовал бы неспецифический фермент; кроме того, подобный механизм предполагает специфическое взаимодействие аминокислоты с соответствующим антикодоном.

3. Специфичность обусловлена участком фермента, который может взаимодействовать с антикодоном только определенной т-РНК, поскольку именно антикодон является этим специфическим участком. В настоящее время единственным возможным механизмом специфического взаимодействия фермента с полинуклеотидным образованием, какой есть т-РНК, является предположение о наличии в составе фермента нуклеотидного, или, точнее, полинуклеотидного компонента.

Для взаимодействия с антикодоном данный компонент должен иметь, по крайней мере, три последовательно расположенных нуклеотида в виде триплета, идентичного кодону. Не исключено наличие большего количества нуклеотидов.

Таким образом, из рассмотренных трех возможных механизмов специфического взаимодействия фермента активации с т-РНК наиболее приемлемым является комплементарный механизм взаимодействия нуклеотидного участка фермента с антикодоном т-РНК.

Имеется несколько путей исследования наличия подобного нуклеотидного участка фермента и определения его состава и свойства. Первый путь—это выделение и очистка фермента, его гидролиз и обнаружение в гидролизате фосфора и нуклеотидов. Данный путь, при возможности осуществления, является перспективным для непосредственного определения состава и последовательности нуклеотидов различных кодонов, поскольку в нуклеотидном участке фермента предполагается наличие либо одного триплета—кодона, либо ограниченного числа нуклеотидов.

Другим возможным путем исследования является использование радиоактивного фосфора. В настоящей статье мы рассматриваем возможность использования данного метода для определения наличия нуклеотидного участка в составе молекулы фермента активации аминокислот.

Ясно, что если в состав какого-либо фермента входит фосфор, то, используя P^{32} , можно со временем, зависящим от распада P^{32} , иметь уменьшение активности фермента, если фосфор в активности фермента принимает участие. При распаде атома P^{32} нуклеотид, если таковой имеется, должен быть разрушен, и специфического взаимодействия с антикодоном, следовательно, не будет, а это значит, что при наличии в среде субстрата (меченая аминокислота), фермента, синтезированного в присутствии P^{32} , и бесклеточной системы, обеспечивающей синтез белка, последний со временем будет уменьшаться пропорционально количеству фермента с частично разрушенной нуклеотидной частью. Скорость образования «неполноценного» фермента зависит от скорости распада P^{32} .

Отсюда ясно, что, зная характер распада P^{32} , определяя потерю активности фермента активации со временем и сравнивая эти изменения, можно сделать заключение о наличии нуклеотидной части и о составе этого участка (т. е. о количестве атомов P^{32} в этом участке).

Данный метод имеет большие преимущества перед методом непосредственного определения нуклеотидов в молекуле фермента активации, так как не требует исключительно чистого фермента и его довольно значительных количеств; в качестве объекта исследования достаточно иметь любую смесь ферментов и в количестве, обеспечивающем проведение экспериментов по биосинтезу белков в бесклеточной системе.

Однако для проведения экспериментов с использованием данного метода необходимо точно рассчитать возможность его использования, так как кривая падения активности зависит от соотношения количеств активных и неактивных атомов фосфора.

Если количество радиоактивных атомов по отношению к количеству нерадиоактивных мало, что обычно имеет место при использовании препаратов P^{32} с низкой удельной активностью, то падение кривой активности фермента не может быть связано с разрушением нуклеотидной части.

Таким образом необходимо: точно рассчитать кривую распада P^{32} , относительную долю радиоактивных и нерадиоактивных атомов в препаратах P^{32} , а также определить минимальную удельную активность препарата P^{32} , которая дала бы возможность с достоверностью говорить об изменении активности фермента, зависящего от распада P^{32} .

Обозначим через A_0 активность фермента в начале эксперимента, а через A_t —спустя время t . A_0 пропорционально количеству фермента. A_0 представляет собой суммарную активность фермента, в состав которого входят нерадиоактивный и радиоактивный фосфор. Следовательно,

$$A_0 = K(M_0 + N_0),$$

где M_0 —количество фермента, в состав которого входит нерадиоактивный фосфор, т. е. стабильный фермент, а N_0 —количество фермента, в состав которого входит P^{32} , т. е. нестабильный фермент; K —коэффициент пропорциональности, показывающий отношение активности фермента к количеству фермента. Выражая активность фермента через его количество, т. е. когда $K=1$, получим

$$A_0 = M_0 + N_0,$$

Через время t часть фермента, имеющего в своем составе P^{32} , будет разрушена согласно закону радиоактивного распада

$$N_t = N_0 e^{-\lambda t},$$

где N_0 —количество радиоактивных атомов (или, что то же—количество фермента, содержащего P^{32}) при $t=0$ (начало эксперимента), N_t —количество радиоактивных атомов в момент t , e —основание натурального логарифма, λ —постоянная распада [4, 5].

Через время t

$$A_t = M_t + N_t$$

Поскольку $M_0 = M_t$, т. е. количество фермента, имеющего в своем составе нерадиоактивный фосфор, не меняется, то

$$A_t = M_0 + N_0 e^{-\lambda t}.$$

Если выразить λ через период полураспада, то из известного соотношения $\lambda T = 0,693$, получим

$$A_t = M_0 + N_0 e^{-\frac{0,693 \cdot t}{T}}.$$

При отсутствии в среде P^{32} $N_0 = N_t = 0$, тогда $A_0 = M_0$, $A_t = M_t$; поскольку $M_0 = M_t$, то $A_0 = A_t$. Если же в среде имеется исключительно радиоактивный фосфор, то $A_0 = N_0$, а $A_t = N_0 e^{-\lambda t}$. В последнем случае потери активности фермента будут идти по закону радиоактивного распада, если учесть, что ответственным за потери активности будет один атом фосфора; при большем количестве атомов фосфора в молекуле фермента потеря активности фермента будет идти согласно уравнению

$$A_t = M_0 + N_0 e^{-\lambda t n}, \quad \text{при } n \ll N_0, \quad (1)$$

где n —количество радиоактивных атомов в одной молекуле фермента. Чем больше n , тем быстрее потеря активности, и, наоборот, чем сильнее отличается кривая падения активности от кривой радиоактивного распада, тем больше n , и, производя соответствующие расчеты и строя кривые, возможно определить количество атомов фосфора, входящих в молекулу фермента.

Как было сказано, при отсутствии радиоактивных атомов ферментативная активность целиком зависит от молекулы фермента, имеющего в своем составе нерадиоактивные атомы фосфора, и, наоборот, если в среде присутствует исключительно радиоактивный фосфор, то вся ферментативная активность будет обусловлена молекулами фермента, в состав которых входит P^{32} . В обычных условиях, в которых проводятся эксперименты с P^{32} , мы имеем смесь обоих типов атомов, поэтому ферментативная активность будет обуславливаться обоими типами молекул. Соотношение же этих типов молекул может быть определено, исходя из удельной активности радиоактивного препарата.

Как известно [4], удельная активность—это активность 1 г вещества, выраженная в кюри. В одном грамм-атоме любого изотопа содержится $6,0 \cdot 10^{23}$ атомов. Если a —масса одного грамм-атома, m —масса препарата, а N —число атомов в препарате, то

$$N = \frac{6,02 \cdot 10^{23} \cdot m}{a}.$$

Так как

$$A \text{ расп/сек} = N \lambda,$$

где λ —постоянная распада, а N —число атомов, то

$$A \text{ расп/сек} = \frac{6,02 \cdot 10^{23} \lambda m}{a}$$

или

$$A \text{ кюри} = \frac{6,02 \cdot 10^{23} \cdot \lambda m}{3,7 \cdot 10^{10} \cdot a} = 1,63 \cdot 10^{13} \frac{\lambda m}{a}.$$

Или, выражая через период полураспада T ,

$$A \text{ кюри} = 1,63 \cdot 10^{13} \frac{0,693}{T} \cdot \frac{m}{a},$$

или

$$A \text{ кюри} = 1,13 \cdot 10^{13} \frac{m}{Ta}.$$

Если вещество состоит только из активных атомов, то удельная активность α будет равна

$$\alpha = \frac{A \text{ кюри}}{m} = 1,13 \cdot 10^{13} \frac{1}{Ta}.$$

Если удельную активность выразить в кюри/г, то

$$\alpha = \frac{1,13 \cdot 10^{13}}{Ta} = \frac{1,13 \cdot 10^{13}}{14,3 \cdot 24 \cdot 60 \cdot 60 \cdot 32} = 2,89 \cdot 10^5 \text{ кюри/г.}$$

Следовательно, удельная активность препарата P^{32} , состоящего исключительно из радиоактивных атомов, будет равна $2,89 \cdot 10^5$ кюри/г. Любой препарат с меньшей удельной активностью будет иметь соответственно меньшее количество радиоактивных атомов. Поэтому отношение удельных активностей чистого радиоактивного препарата α и удельной активности используемого препарата α_1 покажет отношение количеств радиоактивных атомов

$$\frac{\alpha_1}{\alpha} = \frac{L_1}{L}, \quad L_1 = L \frac{\alpha_1}{\alpha},$$

где L и L_1 —количества радиоактивных атомов в абсолютно радиоактивном и используемом препаратах соответственно.

Общее количество атомов M в радиоактивном препарате будет равно сумме радиоактивных L_1 и нерадиоактивных M_0 атомов

$$M = M_0 + L_1.$$

В свою очередь, M_0 будет равно

$$M_0 = L - L \frac{\alpha_1}{\alpha};$$

принимая $L = N_0$ и подставляя полученные значения в уравнение (1), получим

$$A_t = N_0 \left(1 - \frac{\alpha_1}{\alpha} + \frac{\alpha_1}{\alpha} e^{-\lambda t_n} \right),$$

■ **И**, выражая через начальную ферментативную активность,

$$A_t = A_0 \left(1 - \frac{\alpha_1}{\alpha} + \frac{\alpha_1}{\alpha} e^{-\lambda t_n} \right),$$

т. е. ферментативная активность в момент t будет равна произведению начальной активности и множителя

$$\left(1 - \frac{x_1}{\alpha} + \frac{\alpha_1}{\alpha} e^{-\lambda t_n}\right).$$

Таким образом, в данном уравнении A_t и A_0 определяются экспериментально, α , α_1 и t известны; подставляя $n = 1, 2, \dots, x$, можно получить кривые падения ферментативной активности, зависящей от распада P^{32} в смеси ферментов с радиоактивным и нерадиоактивным фосфором. При $x_1 \ll \alpha$ члены $\frac{\alpha_1}{\alpha}$ и $\frac{\alpha_1}{\alpha} e^{-\lambda t_n}$ стремятся к нулю и A_t со временем не будет меняться. Поэтому использование метода определения падения активности фермента, синтезированного в среде с P^{32} , пропорционального распаду P^{32} , в этом случае невозможно. Поскольку удельная активность препарата P^{32} , имеющего исключительно радиоактивные атомы, равна $2,89 \cdot 10^5$ кюри/г, а коммерческие препараты P^{32} имеют удельную активность, равную 10—100 мкюри на грамм и менее, то в этих условиях $\alpha_1 \ll \alpha$ и $\frac{\alpha_1}{\alpha} \rightarrow 0$.

Из сказанного видно, что использование этого метода может быть осуществлено только при наличии препаратов с очень высокой удельной активностью.

Ереванский государственный университет,
кафедра биофизики

Поступило 11.VII 1966 г.

Գ. 2. ՓՆՆՈՅԱՆ

ԱՄԻՆԱԹՔՈՒՆԵՐԸ ԱԿՏԻՎԱՑՆՈՂ ՖԵՐՄԵՆՏԻ ՍՏՐՈՒԿՏՈՒՐԱՆ ՈՐՈՇԵԼՈՒ ՀԱՄԱՐ ԻԶՏՈՏՈՊԱՅԻՆ ՄԵԹՈԳԻ ԿԻՐԱՌՄԱՆ ՀՆԱՐԱՎՈՐՈՒԹՅԱՆ ՀԱՐՑԻ ՇՈՒՐՋԸ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

1. Ենթադրվում է, որ ամինաթթուները ակտիվացնող ֆերմենտի սպեցիֆիկությունը համապատասխան տրանսպորտային ՌՆԹ-ի նկատմամբ պայմանավորված է մոլեկուլում նուկլեոտիդային մասի առկայությամբ, որը կոմպլեմենտար է տրանսպորտային ՌՆԹ-ի անտիկոդոնին:

2. Նման նուկլեոտիդային մասի առկայության հետազոտման համար քննարկվում է իզոտոպային մեթոդի կիրառման հնարավորությունը, որպիսի մեթոդի սկզբունքը հետևյալն է. բիոօբյեկտը, որից անջատվելու է ամինաթթուները ակտիվացնող ֆերմենտը, աճեցվում է P^{32} պարունակող միջավայրի վրա, եթե P^{32} մտնում է տվյալ ֆերմենտի կազմի մեջ և ֆերմենտի սպեցիֆիկությունը կախված է նուկլեոտիդներից, որոնց կազմի մեջ մտնում է P^{32} , ապա P^{32} -ի, հետևաբար նաև նուկլեոտիդային մասի քայքայումը կհանգեցնի ֆերմենտատիվ ակտիվության կորուստի:

3. Համապատասխան հաշվումների հիման վրա առաջարկվում է ֆերմենտատիվ ակտիվության հետևյալ հավասարումը ամինաթթուները ակտիվացնող ֆերմենտի համար, որն իր մեջ պարունակում է

$$A_t = A_0 \left(1 - \frac{\alpha_1}{\alpha} + \frac{\alpha_1}{\alpha} e^{-\lambda_1 t} \right),$$

որտեղ A_t — ֆերմենտի ակտիվությունն է ժամանակամիջոցում,

A_0 — ֆերմենտի սկզբնական ակտիվությունն է,

γ — ռադիոակտիվ քայքայման հաստատունն է,

t — փորձի ժամանակամիջոցն է,

n — ֆոսֆորի մոլեկուլների թիվն է ֆերմենտի մեկ մոլեկուլում,

α — բացառապես ռադիոակտիվ ատոմներից կազմված ֆոսֆորի պրեպարատի ակտիվությունն է (հավասար է $2,89 \cdot 10^5$ կյուրի/գ), որը կիրառվում է ֆերմենտի բիոսինթեզի համար,

α_1 — օգտագործվող ֆոսֆորի պրեպարատի տեսակարար ակտիվությունն է:

4. Հաշվումները ցույց են տվել, որ սովորական տեսակարար ակտիվության դեպքում (10—100 մկյուրի/գ չափով) տվյալ մեթոդը չի կարող կիրառվել, քանի որ $\alpha_1 \ll \alpha$ և $\frac{\alpha_1}{\alpha} \rightarrow 0$: Իզոտոպային մեթոդի օգտագործումը չափազանց հեռանկարային է ֆոսֆորի պրեպարատների շատ բարձր տեսակարար ակտիվություն ունենալու դեպքում:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Биосинтез белка и нуклеиновых кислот. Под ред. А. С. Спирина, М., 1965.
2. Бреслер С. Е. Основы молекулярной биологии, 1963.
3. Грюнберг-Монаго М. и Ф. Гро. Сб. Молекулярная биология. Проблемы и перспективы. 40—84, 1965.
4. Иванов И. И. и др. Радиоактивные изотопы в медицине и биологии. М., 1955.
5. Комар С. Радиоактивные изотопы в биологии и сельском хозяйстве. М., 1957.
6. Шантрян Ю. Биосинтез белков. М., 1963.
7. Шапвиль Ф. Сб. Молекулярная биология. Проблемы и перспективы. М., 1965.