БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ
том 2 * № 8 * 1976

УДК 577.158.1.013

НУКЛЕОТИДЫ, КОФЕРМЕНТЫ, ФОСФОРНЫЕ ЭФИРЫ

XXIX. ЗАВИСИМОСТЬ КОФЕРМЕНТНОЙ АКТИВНОСТИ АНАЛОГОВ FAD ОТ ДЛИНЫ ФОСФОАНГИДРИДНОЙ ЦЕПИ

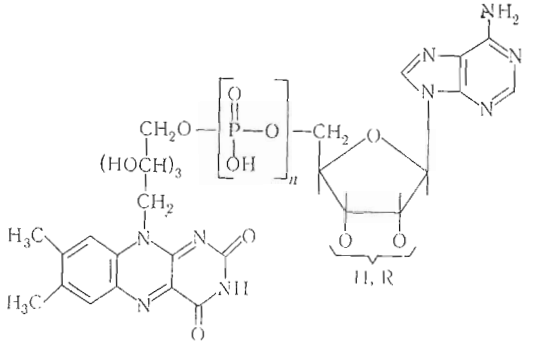
Шапиро Т. А., Хомутова Е. Д., Березовский В. М.

Всесоюзный научно-исследовательский витаминный институт, Москва

Установлено, что сокращение или удлинение фосфоангидридной цепи в аналогах FAD или введение дополнительной фосфорной группы в аденозиновую часть молекулы вызывает снижение активности в отношении апофермента оксидазы *D*-аминокислот как за счет ухудшения связывания аналогов с апоферментом, так и за счет уменьшения скорости превращения реакционного комплекса фермент — субстрат.

В нашей лаборатории был осуществлен синтез FAD [1, 2] и его аналогов с модифицированной флавиновой и адениновой частями молекулы, таких, как 2′-дезокси-FAD [3], 2-тио-FAD [4], флавинуридиндинуклеотид и флавингуанозиндинуклеотид [5]. Показано [6, 7], что изменение флавиновой и в особенности адениновой части молекулы FAD приводит к значительному снижению коферментной активности полученных соединений в отношении оксидазы *D*-аминокислот [КФ 1.4.3.3].

В этой связи нами были синтезированы близкие к FAD соединения, в которых флавиновая и адениновая части молекулы оставались неизменными, но которые различались длиной фосфоангидридной цепи (от одного до четырех атомов фосфора), соединяющей нуклеозидные остатки, или наличием дополнительной фосфорной группы в аденозиновой части молекулы (аналог типа NADP) [8, 9]:



n	R	
1	H	FpA
2	H	FppA(FAD)
3	H	FpppA
4	H	FppppA
2	PO—$(OH)_2$	FADP

Данными методов кругового дихроизма, флуоресценции и ПМР показано, что у таких аналогов в водном растворе существует внутримолекулярное взаимодействие между флавиновой и адениновой частями, которое ослабевает с удлинением фосфоангидридной цепи [10].

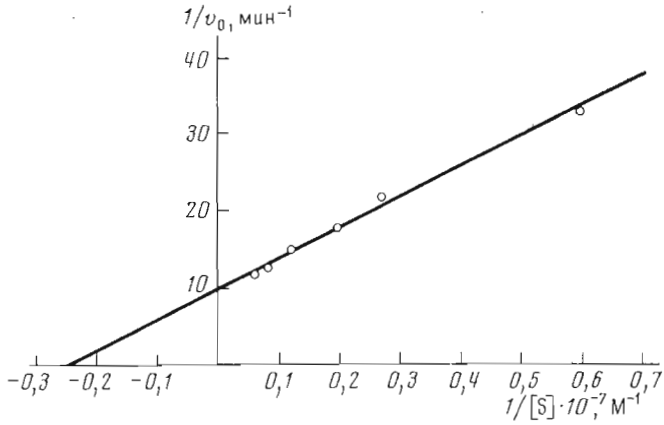


Рис. 1. Зависимость скорости реакции ($\Delta D/\Delta t$) окисления *D*-аланина от концентрации FAD

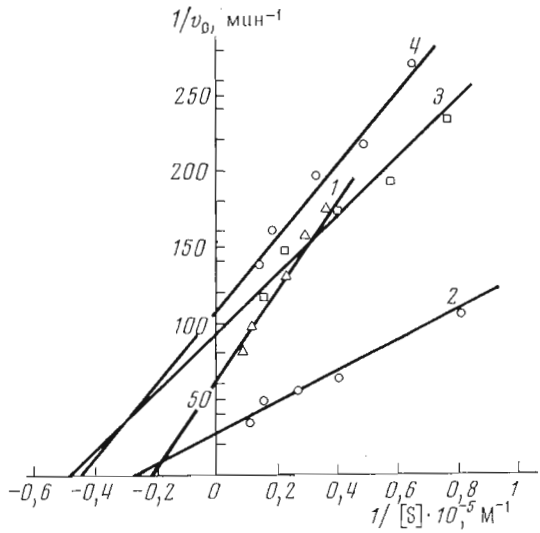


Рис. 2. Зависимость скорости реакции окисления *D*-аланина от концентрации аналогов FAD: *1* — FpA; *2* — FpppA; *3* — FppppA; *4* — FADP

Синтезированные аналоги оказались мощными конкурентными ингибиторами ($K_i \approx 10^{-7}$ М) высокоочищенной моноаминооксидазы (КФ 1.4.3.4) [11] из *Sarcina lutea*. Коферментная активность аналогов была испытана нами в реакции, катализируемой оксидазой *D*-аминокислот (таблица). В качестве субстрата использовали *D*-аланин; за скоростью ферментативной реакции следили по количеству образующейся пировиноградной кислоты, определяемой при помощи сопряженной лактатдегидрогеназной системы [12]. Для удаления выделяющейся перекиси водорода в инкубационную смесь добавляли избыток каталазы.

Величина K_m, определенная для FAD (таблица, рис. 1), соответствовала литературным данным [13, 14]; величины K_m для аналогов (таблица, рис. 2) почти на два порядка выше, чем для FAD, и близки между собой. Таким образом, уменьшение или увеличение длины фосфоангидридной цепи, соединяющей две гетероциклические части молекулы в аналогах FAD, приводит к снижению коферментной активности этих соединений по сравнению с FAD за счет резкого ухудшения связывания аналогов с апоферментом.

Коферментная активность аналогов FAD в реакции с оксидазой *D*-аминокислот

Кофермент	Коферментная активность, %	K_m, М·10⁷	V^*, мкмоль·мг⁻¹·мин⁻¹
FpA	38,8	480	6,95
FppA(FAD)	100	4	96,7
FpppA	25	390	15,8
FppppA	10	210	4,75
FADP	9,4	230	3,9

* Поскольку установлено [15], что скорость реакции окисления *D*-аланина пропорциональна концентрации апофермента, для определения *V* FAD был сделан соответствующий пересчет.

Величины *V* для реакции окисления *D*-аланина оксидазой *D*-аминокислот при использовании в качестве коферментов аналогов FAD значительно ниже, чем для FAD. Обращает на себя внимание тот факт, что между аналогами FAD наблюдается заметно большее различие по величине *V*, чем по величине K_m. Так, FpppA менее активен в качестве кофермента по сравнению с FAD лишь в 6 раз, а FADP — в ~25 раз. Эти данные могут свидетельствовать о том, что скорость превращения реакционноспособного комплекса фермент—субстрат в случае аналогов существенно меньше по сравнению с природным коферментом, а также об изменении величины сродства субстрата к ферменту при замене природного кофермента на его аналог.

Экспериментальная часть

Апооксидаза D-аминокислот выделена из коммерческого препарата оксидазы *D*-аминокислот фирмы «Reanal» (Венгрия) диализом против 25%-ного раствора $(NH_4)_2SO_4$ в течение 2 сут при ~20° [12]. Полученный раствор содержал 1,25 мг белка/1 мл (концентрация определена спектрофотометрически).

Лактатдегидрогеназа из мышц свиньи фирмы «Reanal» была отделена от $(NH_4)_2SO_4$ центрифугированием суспензии при 10 000 об/мин, растворением полученного осадка в 5 мл K-Na-фосфатного буфера, pH 7,5, центрифугированием в течение 5 мин при 10 000 об/мин и разбавлением надосадочной жидкости фосфатным буфером до $D = 1{,}29$ при 280 нм, что соответствует 1 мг белка/1 мл.

Определение коферментной активности аналогов FAD. Пробы с конечным объемом 3 мл, содержащие 0,1 мг каталазы (Олайнского завода химреактивов), 0,1 мг лактатдегидрогеназы, 0,375 мг апооксидазы *D*-аминокислот, 0,3 мг NADH и FAD или аналог FAD в концентрации $2 \cdot 10^{-4}$ М в 0,01 М K-Na-фосфатном буфере, pH 7,5, предынкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Реакцию начинали добавлением 5 мг α-*D*-аланина в 0,15 мл K-Na-фосфатного буфера. Уменьшение оптической плотности при 340 нм [12] измеряли на приборе СФ-4А с интервалом в 3 мин. Расчет коферментной активности аналогов проводили сравнением скоростей ферментативной реакции ($\Delta D/\Delta t$) в присутствии FAD и его аналогов.

Определение K_m по отношению к FAD и аналогам FAD. Пробы с конечным объемом 3 мл, содержащие 1 мг каталазы, 0,2 мг лактатдегидрогеназы, апооксидазу *D*-аминокислот (в случае FAD — 0,25 мг, в случае аналогов — 0,375 мг), 0,3 мг NADH и FAD в концентрациях $1{,}68 \cdot 10^{-6}$ — $1{,}68 \cdot 10^{-7}$ М или аналоги в концентрациях $1{,}2 \cdot 10^{-4}$ — $2{,}5 \cdot 10^{-5}$ М (FpA), $9{,}2 \cdot 10^{-5}$ — $1{,}2 \cdot 10^{-5}$ М (FpppA), $6{,}45 \cdot 10^{-5}$ — $1{,}2 \cdot 10^{-5}$ М (FppppA), $7{,}7 \cdot 10^{-5}$ — $1{,}4 \cdot 10^{-5}$ М (FADP) в 0,01 М K-Na-фосфатном буфере предынкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Реакцию начинали добавлением 7 мг α-*D*-аланина в 0,2 мл K-Na-фосфатного буфера. Скорость реак-

ции определяли, регистрируя оптическую плотность раствора при 340 нм на анализаторе скорости реакции шведской фирмы LKB. Начальную скорость реакции (v_0) определяли как тангенс угла наклона касательной к начальному участку кинетической кривой. При расчете количества продукта реакции ε_{340} для NADH принимали равным 6220. Константу Михаэлиса определяли из графика зависимости скорости реакции от концентрации FAD или аналога в двойных обратных координатах [16]. Из этого же графика определяли величины V, которые выражали как количество D-аланина (мкмоль), окисленного за 1 мин 1 мг ферментного белка.

ЛИТЕРАТУРА

1. Хомутова Е. Д., Шапиро Т. А., Березовский В. М. (1965) Ж. общ. химии. Сб. Биологически активные соединения, 230—232.
2. Хомутова Е. Д., Шапиро Т. А., Мезенцева М. В., Березовский В. М. (1967) Хим.-фармацевт. ж., № 1, 11—15.
3. Еременко Т. В., Березовский В. М. (1965) Ж. общ. химии. Сб. Биологически активные соединения, 234—241.
4. Мельникова Л. М., Березовский В. М. (1973) Ж. общ. химии, **43**, 921—926.
5. Березовский В. М., Аданяева Р. В. (1967) Ж. общ. химии, **37**, 2639—2643.
6. McCormick D., Chassy B., Tsibris J. (1964) Biochim. et biophys. acta, 89, 447—453.
7. Arsenis C., McCormick D. (1964) Biochim. et biophys. acta, **92**, 440—445.
8. Хомутова Е. Д., Шапиро Т. А., Березовский В. М. (1970) Ж. общ. химии, **40**, 470—474.
9. Шапиро Т. А., Хомутова Е. Д., Березовский В. М. (1972) Ж. общ. химии, **42**, 1634—1638.
10. Мищенко В. В., Шапиро Т. А., Рубчинская Ю. М., Христианович Д. С., Хомутова Е. Д., Березовский В. М. (1973) Ж. общ. химии, **43**, 2547—2551.
11. Татьяненко Л. В., Шапиро Т. А., Яковлев В. А., Горкин В. З., Хомутова Е. Д., Пивоваров А. П., Гвоздев Р. И., Лебедева О. И. (1974) Молекулярн. биология, 8, 871—878.
12. Pearson W. (1967) The Vitamins, VII, pp. 121—126, Acad. Press, N. Y.— London.
13. Yagi K., Ozawa T. (1960) Biochim. et biophys. acta, **42**, 381—387.
14. Yagi K., Ozawa T., Nagatsu T. (1960) Biochim. et biophys. acta, **43**, 310—317.
15. De Luca C., Weber M., Kaplan N. (1956) J. Biol. Chem., **223**, 559—561.
16. Linewiver H., Burk D. (1934) J. Amer. Chem. Soc., **56**, 658.

Поступила в редакцию
19.I.1976

NUCLEOTIDES, COENZYMES, PHOSPHORIC ESTERS. XXIX. DEPENDENCE OF COENZIME ACTIVITY OF FAD ANALOGS ON THE PHOSPHOANHYDRIDE CHAIN LENGTH

SHAPIRO T. A., KHOMUTOVA E. D., BEREZOVSKY V. M.

All-Union Institute for Vitamin Research, Moscow

It has been shown that shortening or lengthening of the phosphoanhydride chain of FAD analogs or introduction of an additional phosphoric group into the adenosine fragment of molecule results in the activity reduction towards the apoenzyme of D-amino acid oxidase. This is found to be due both to decrease in analogs binding with apoenzyme and to reduction of the conversion rate of the reactive enzyme-substrate complex.