

УДК 577.15

### СТРУКТУРА, МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ КРЕАТИНКИНАЗЫ. III. ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ НЕИДЕНТИЧНОСТЬ СУБЪЕДИНИЦ

З. С. МКРТЧЯН, М. Г. ГАЗАРЯНЦ, Л. С. НЕРСЕСОВА, Ж. И. АКОПЯН

Гомогенный препарат креатинкиназы после инкубации в 5—7 М мочевины подвергается разделению на две практически равные фракции при хроматографии на сефарозе с иммобилизованным аналогом АТФ. Эти фракции соответствуют двум субъединицам фермента М и М', отличающимся электрофоретической подвижностью, оптимальным рН и удельной активностью. Сделано предположение о роли процесса ассоциации—диссоциации в регуляции активности фермента.

*Ключевые слова:* креатинкиназа, субъединицы фермента, регуляция активности.

Ранее при исследовании взаимодействия креатинкиназы из мышц кролика с синтетическими аналогами АТФ было выявлено неидентичное поведение субъединиц фермента в процессе афинной модификации. На основании этого было сделано допущение о различной степени сродства субъединиц креатинкиназы к нуклеотидным субстратам АТФ и АДФ [1, 4].

Помимо полученных нами экспериментальных данных имеется достаточное количество сведений о функциональной неидентичности субъединиц креатинкиназы. Так, результаты работ ряда авторов [8, 13, 15] позволили сделать следующие выводы: в комплексе «аналога переходного состояния» субъединицы креатинкиназы ведут себя неидентично; связывание АДФ с ферментом выявляет свойство, характерное или для отрицательной кооперативности между двумя центрами связывания, или для неидентичных центров связывания. О неидентичности субъединиц в комплексе «аналога переходного состояния» свидетельствует также бифазный характер протеолитической реакции протеназы К с креатинкиназой в присутствии комбинаций субстрата  $Mg$  АДФ +  $Cr$  +  $NO_3$  [18].

Высказывалось, кроме того, предположение о несимметричной субъединичной организации креатинкиназы в растворе, что, по мнению авторов, не исключает кооперативного взаимодействия между субъединицами в димере [10—12]. Несимметричную субъединичную организацию имеет в растворе и дрожжевая гексокиназа [11].

Итак, экспериментальные данные последних лет свидетельствуют о неидентичности поведения субъединиц креатинкиназы. Невыясненным оставался вопрос, являются ли эти субъединицы неравноценными изначально, или их неидентичность проявляется лишь при взаимодействии с лигандами.

С целью выяснения этого вопроса на основании предположения о различном сродстве субъединиц фермента к нуклеотидным субстратам нами было осуществлено разделение субъединиц креатинкиназы по

средству на сефарозе с иммобилизованным аналогом АТР, после предварительной диссоциации в мочеине [5].

Результаты хроматографического разделения показали (рис. 1) что при этом фермент делится на две практически равные части.

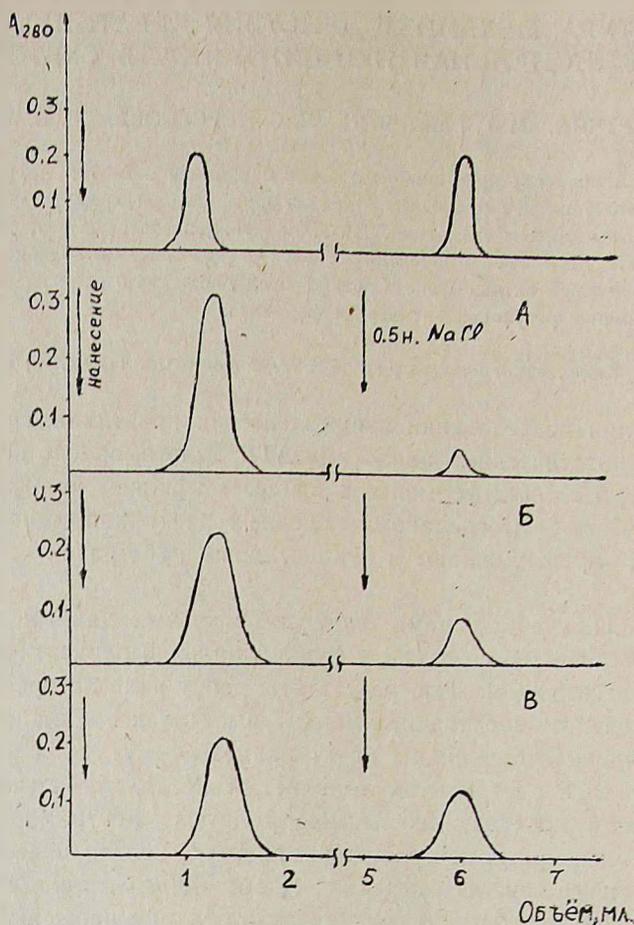


Рис. 1. Хроматографическое разделение М- и М'-субъединиц креатинкиназы на сефарозе с иммобилизованным (6-аминогексил)- $\gamma$ -амидом АТР. Первый пик—препарат М-, второй—М'-субъединицы фермента. А—после предварительной инкубации креатинкиназы в 5 М мочеине; Б—препарат фермента нанесен на колонку сразу после растворения в 0,05 М трис-НСI буфере; В—раствор фермента выдержан при 4° в течение трех суток.

Сравнение электрофоретической подвижности исходного препарата креатинкиназы и белковых материалов, соответствующих первому и второму пикам, полученным при хроматографии на АТР-сефарозе диссоциирующих условиях, а также интенсивностей полос в гелях показывает, что с афинной колонки в первом пике элюируется менее подвижная субъединица креатинкиназы (М), а во втором—более подвижная (М'). Различие в подвижности субъединиц невелико, но достоверно. Оно может отражать либо разницу в молекулярных массах субъединиц, либо—в пространственной структуре субъединиц. Отметим, что есть допущение [18], согласно которому креатинкиназа из мышц кро-

лика состоит из двух близких по молекулярной массе субъединиц—42100 и 40300.

Результаты наших исследований показали, что отдельные субъединицы обладают каталитической активностью. Исследование креатинкиназной реакции в прямом и обратном направлениях препаратов М и М'-субъединиц показало, что обе субъединицы катализируют как реакцию образования креатинфосфата (прямая реакция), так и реакцию переноса фосфорила с креатинфосфата на АДР (обратная реакция), но при разных рН среды: оптимум обратной реакции для М-субъединицы находится в диапазоне 7,8—8,5, а в прямой—в диапазоне 8,5—9,5; для М'-субъединицы он соответственно находится в диапазоне 5,0 и ниже и 5,2—5,8 [5].

Таким образом, одна из субъединиц креатинкиназы более активна при рН среды выше 6,5, а вторая, наоборот, при более низких значениях рН.

Определение удельных активностей препаратов субъединиц при оптимальных значениях рН среды для каждой из них в обоих направле-

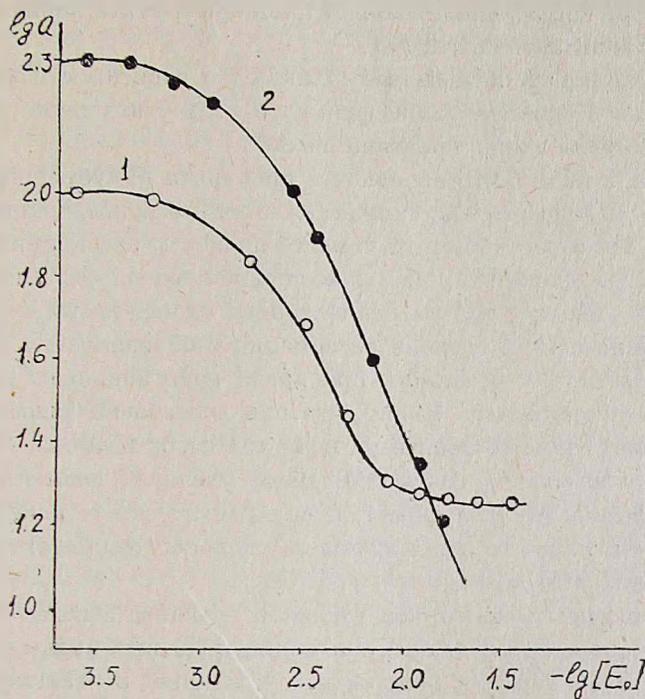


Рис. 2. Зависимость удельной ферментативной активности препаратов креатинкиназы от концентрации фермента в реакции образования креатинфосфата при рН среды 9,0. Кривая 1—препарат М-субъединицы фермента; кривая 2—исходный препарат димера ММ', (а)—в мкэ. экв.

Н /мин. мг,  $(E_0)$ —мг/мл.

ниях реакции показало, что у М'-субъединицы она в 3—4 раза ниже активности М-субъединицы. Следует отметить, что препарат М'-субъединицы оказался менее стабильным при диализе, концентрировании и последующем хранении. Он практически полностью терял актив-

ность при хранении в течение двух суток, в то время как препарат М-субъединицы сохранял 50—40% первоначальной активности.

Тот факт, что нативный фермент (димер) не задерживается на сепарозной колонке с иммобилизованным аналогом АТР и частично элюируется при нанесении, а задерживается только М'-субъединица креатинкиназы, указывает на возрастание сродства последней к иммобилизованному аналогу АТР по мере диссоциации фермента на отдельные субъединицы (рис. 1). Степень диссоциации фермента зависит от его концентрации и температуры раствора. Количественная сорбция М'-субъединицы на сепарозной колонке с иммобилизованным аналогом АТР осуществляется только после предварительной обработки фермента мочевиной.

Способность фермента к диссоциации при хранении и колебания ферментативной активности при этом навели на мысль о возможной роли процесса ассоциации—диссоциации в регуляции его активности.

Известно, что в диссоциирующих ферментных системах типа  $P \rightleftharpoons 2p$ , где белковый олигомер  $P$  способен обратимо диссоциировать на две половинки  $p$ , варьирование концентрации фермента приводит к изменению удельной активности [3].

Представлялись интересными данные о зависимости удельной активности «а» от концентрации фермента ( $E_0$ ) у исходного препарата и препаратов субъединиц креатинкиназы.

Из рис. 2 видно, что активность препарата М-субъединицы, так же как и исходного фермента, снижается с ростом концентрации ( $E_0$ ). Если учесть, что в растворе имеют место процессы ассоциации—диссоциации молекулы фермента, то можно предположить, что уменьшение активности фермента с ростом концентрации скорее всего связано со смещением равновесия в сторону ассоциации с образованием менее активного димера  $MM'$  у исходного препарата креатинкиназы и  $MM$  у препарата М-субъединицы. Видно, что при достаточно малых концентрациях фермента кривая зависимости  $\lg$  «а» от  $\lg$  ( $E_0$ ) для М-субъединицы выходит на плато, соответствующее удельной ферментативной активности формы М (120 ед/мг), а при достаточно больших концентрациях его—на плато, соответствующее удельной ферментативной активности формы  $MM$  (19 ед/мг).

Необходимо отметить, что удельная активность исходного препарата креатинкиназы при разных значениях рН, оптимальных для исходного димера  $MM'$  и для каждой из субъединиц в реакции дефосфорилирования креатинфосфата, также уменьшается с ростом концентрации фермента.

Снижение ферментативной активности при ассоциации белковых молекул, как следует из работы [3], может быть связано со стерическим экранированием активных центров фермента. Это наблюдается, например, в случае с эстрадиол-17-дегидрогеназой из плаценты человека [2] и фосфорилзой В из скелетных мышц кролика [7].

То обстоятельство, что отдельные субъединицы способны ассоциировать между собой с образованием гомодимеров типа  $MM$  и  $M'M'$ , видно из данных электрофореза препарата М-субъединицы в нативных

условиях [5]. Электрофоретическая подвижность препарата М-субъединицы и исходного препарата димера ММ практически одинакова, что указывает на способность М-субъединицы к ассоциации с образованием гомодимера ММ'. Снижение удельной активности димера по сравнению с мономерами в случае с креатинкиназой может быть связано как с частичным экранированием активных центров фермента при образовании димерной формы фермента, так и с более сложными кооперативными взаимодействиями между субъединицами.

Более подробно динамика четвертичной структуры креатинкиназы изучена Розановой и Четвериковой [6]: показано, что креатинкиназа из мышц кролика представляет собой диссоциирующую ферментную систему, равновесие в которой зависит от рН, ионной силы и концентрации белка. Димерная молекула в определенных условиях диссоциирует на каталитически активные мономеры, причем удельная ферментативная активность и содержание тиоловых групп у мономера выше, чем у димерной формы.

Надо отметить, что в быстро диссоциирующей ферментной системе типа  $P \rightleftharpoons 2p$  смещение равновесия между олигомерными формами зависит от присутствия субстратов, эффекторов и модификаторов. Важно также подчеркнуть, что в процессе диссоциации и ассоциации не исключена возможность образования различных димеров типа ММ', ММ и М'М'. Это совпадает с результатами работы [9], где для креатинкиназы мышц кролика методом аналитической изофокусировки показано наличие трех полос, две из которых, по предположению авторов, соответствуют гомодимеру, а одна — гетеродимеру. Наличие трех компонентов с тремя близкими изоэлектрическими точками у креатинкиназы, выделенной из мышц кролика, показано и в другой работе [12]. О микрогетерогенности в молекуле креатинкиназы свидетельствуют также данные [16, 17]. Выявлены различия в аминокислотном составе субъединиц фермента.

Таким образом, микрогетерогенность молекулы креатинкиназы, ее способность менять четвертичную структуру, различное сродство субъединиц фермента к субстратам нуклеотидной природы — все это может служить основой для выявления функциональной и структурной организации активного центра этого важного в энергетическом обмене фермента, а также для регуляции его активности.

Институт экспериментальной биологии  
АН Армянской ССР

Поступило 20.II 1984 г.

ԿՐԵԱՏԻՆԿԻՆԱԶԱՅԻ ԿԱՌՈՒՑՎԱԾՔԸ, ԳՈՐԾՈՂՈՒԹՅԱՆ ՄԵՆԱԿԵՂՄԸ.

III. ԵՆԹԱՄԻԱՎՈՐՆԵՐԻ ՖՈՒՆԿՑԻՈՆԱԿԱՆ ՈՉ ԻԴԵՆՏԻԿՈՒԹՅՈՒՆԸ

Ղ. Ս. ՄԿՐՏՁՅԱՆ, Մ. Գ. ՂԱԶԱՐՅԱՆՅ, Լ. Ս. ՆԵՐՍԵՍՈՎԱ, Ժ. Ի. ՇԱԿՈՐՅԱՆ

Կրեատինկինազայի հոմոգեն պատրաստուկը 5—7M միզանյութում ինկուբացիայից հետո ենթարկվում է բաժանման հիմնականում հավասար երկու ֆրակցիաների՝ ԱՏՖ-ի անալոգով իմմոբիլիզացված սեֆարոզի վրա քրոմատոգրաֆիայի ընթացքում: Այդ ֆրակցիաները համապատասխանում են ֆերմեն-

այի M և M' ենթամիավորներին, որոնք միմյանցից տարբերվում են էլեկտրաֆորետիկ շարժունակությամբ, pH օպտիմումով և տեսակարար ակտիվությամբ:

Եզրակացություն է արվում ասոցիացիա-դիսոցիացիա պրոցեսի դերի մասին ֆերմենտի ակտիվության կարգավորման գործում:

## STRUCTURE AND MECHANISM OF ACTION OF CREATINE KINASE III. FUNCTIONAL NON-IDENTITY OF SUBUNITS

Z. S. MKRTCHYAN, M. G. GHAZARYANTS, L. S. NERSESOVA  
Zh. I. HAKOBYAN

Creatine kinase purified to homogeneity after incubation with 5–7 M urea is separated into two mainly equal fractions, corresponding to M and M' subunits of enzyme. These subunits vary by electrophoretic mobility, pH optimum and specific activity. The proposal on the role of process of association and dissociation in the regulation of enzymatic activity is based.

### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Акопян Ж. И., Газарянц М. I., Мкртчян З. С., Нерсесова Л. С., Лаврик О. И., Попов Р. А. Биохимия, 46, 262, 1981.
2. Егорова В. В., Захаричева А. В., Анапченко С. Н. Биохимия, 35, 895, 1970.
3. Курганов Б. И. В кн.: Аллостерические ферменты, 117–147, М., 1978.
4. Мкртчян З. С., Нерсесова Л. С., Акопян Ж. И., Бабкина Г. Т., Бунева В. Н., Кнорре Д. Г. Биохимия, 45, 5806, 1980.
5. Невинский Г. А., Анкилова В. Н., Лаврик О. И., Мкртчян З. С., Нерсесова Л. С., Акопян Ж. И. Биохимия, 48, 339, 1983.
6. Розанова Н.А., Четверикова Е. П. Биохимия, 46, 2125, 1981.
7. Силонова Г. В., Курганов Б. И. Мол. биол., 4, 445, 1970.
8. Bickerstaff G. F., Price N. C. Int. J. Biochem., 9, 1, 1, 1978.
9. Caltan A. R., Jamieson S. M., Milner—White E. I. and Price N. G. Biochem. Soc. Trans., 6, 1, 220, 1978.
10. Degani Y., Degani Ch. Biochemistry, 18, 26, 917, 1979.
11. Degani Ch., Degani Y. J. Biol. Chem., 255, 17, 8821, 1930.
12. Degani Y., Degani Ch. Trends Biochem. Sci., 5, 12, 337, 1980.
13. Mc. Laughlin A. C. J. Biol. Chem., 249, 1445, 1974.
14. Milner—White E. I., James E. Biochem. Soc. Trans., 10, 2, 107, 1982.
15. Price N. G., Hunter M. G. Biochem et biophys acta, 445, 364, 1976.
16. Takasawa T., Shickawa H. J. Biochem. 93, 2, 375, 1983.
17. Takasawa T., Onodera M., Shikawa H. J. Biochem., 93 2, 353, 1983.
18. Williamson J., Green I., Cherif S., Milner—White E. I. Biochem. J., 167, 731, 1977.