ЛИТЕРАТУРА

1. *Аскян Н. О.* Автореф. канд. дисс., Ереван, 1953.
2. *Кононова М. М.* Органическое вещество почвы. М., 1963.
3. *Пономарева В. В., Плотникова Т. А.* Методические указания по определению содержания и состава гумуса в почвах. Л., 1975.
4. *Хуршудян П. А.* Автореф. докт. дисс., Ереван, 1972.
5. *Шарога Э. А., Хачикян Л. А.* Биолог. ж. Армении, №. 6, 1983.
6. *Эдилян Р. А.* Автореф. канд. дисс., Ереван, 1951.
7. *Эдилян Р. А., Хтрян Н. К.* Характеристика прибрежных почвогрунтов озера Севан. Ереван, 1960.

«Биолог. ж. Армении», т. XXXVII, № 4, 1984

УДК 547.963.3

СТРУКТУРА, МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ КРЕАТИНКИНАЗЫ. АФИННАЯ МОДИФИКАЦИЯ ФЕРМЕНТА. II

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

Обсуждается метод афинной модификации ферментов. Рассмотрены основные принципы этого метода. Обобщены экспериментальные данные (собственные и литературные), касающиеся афинной модификации креатинкиназы.

Ключевые слова: креатинкиназа, аналоги нуклеотидных субстратов, афинная модификация.

В настоящее время одним из наиболее информативных методов исследования ферментов можно считать метод афинной модификации, который позволяет локализовать структурные элементы активных центров ферментов и исследовать динамические аспекты взаимодействия различных лигандов с ферментами. Ограниченное число ферментов, изученных этим методом, объясняется сложностью синтеза соответствующих реагентов. При этом синтез реакционноспособных аналогов субстратов, способных к образованию специфических ферментингибиторных комплексов, является еще недостаточным условием для достижения афинной модификации фермента, поскольку в месте локализации химически активной группировки аналога в активном центре может, например, отсутствовать стерически близкая, подходящая химическая связь. Кроме того, может иметь место ковалентное присоединение реагента к ферменту, но не по существенным участкам, а по нуклеотидсвязывающим складкам фермента, как например, в случае взаимодействия фенилаланил-тРНК-синтетазы с γ-(4-азидоанилидом) АТР [4]. Поэтому для выявления модификаторов фермента по активному центру необходимо показать, что взаимодействие фермента с реагентом удовлетворяет критериям процесса афинной модификации, а именно: 1) реагент должен вести себя как конкурентный ингибитор по отношению к субстрату фермента, аналогом которого он является; 2) ковалентное присоединение реагента к ферменту должно приводить к инактивации его, при этом должно наблюдаться соответствие между связыванием

реагента и инактивацией фермента; 3) предельное число молей реагента, ковалентно присоединенного к ферменту, должно быть равно числу участков связывания субстрата; 4) реакция модификации фермента должна подавляться в присутствии избытка субстрата [21].

В последние годы в отделе биохимии НИОХ СО АН СССР и в Институте молекулярной биологии АН СССР проводится направленный синтез серий аналогов нуклеотидов, с помощью которых были выявлены некоторые закономерности строения и механизма действия ряда синтетаз [2, 4] и киназ [9, 23, 29], а также фосфодиэстеразы цАМФ [13], аденилатциклазы [29], Na, K-АТФ-азы [15], митохондриальной АТФ-азы [22].

В связи с тем, что для катализа креатинкиназной реакции наиболее существенным является участок активного центра фермента, в котором локализуется γ-фосфат АТР, представляло интерес изучение взаимодействия с креатинкиназой аналогов АТР, содержащих заместители по γ-фосфату. Успехи в синтезе γ-производных АТР сделали доступным в настоящее время широкий набор аналогов этого важного субстрата [3, 12, 24, 29]. Наряду с фотореагентами, получили распространение алкилирующие производные АТР [6, 12, 23, 29]. Синтез фотоактивных флуоресцентных γ-производных АТР и АДР открывает новые возможности при изучении функциональных и структурных характеристик нуклеотидсвязывающих ферментов [18].

Для аффинной модификации креатинкиназы из скелетных мышц кролика были использованы алкилирующие реагенты 1-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)-бензил-γ-амид АТР и фотоактивный реагент-γ-(р-азидоанилид) АТР, синтезированные в отделе биохимии НИОХ СО АН СССР [3, 24]. Первый аналог в водном растворе образует реакционноспособный этилениммониевый катион, который и взаимодействует с ферментом [24]. Фотоактивный реагент при ультрафиолетовом облучении образует высокоактивные нитреновые радикалы, способные реагировать с любой химической связью [30].

Исследование взаимодействия креатинкиназы с нуклеотидными субстратами и γ-амидами АТР, родственными использованным нами реагентам, показало, что при введении реакционноспособного радикала по γ-фосфату АТР аналоги сохраняют сродство к ферменту. При этом наибольшим сродством обладают аналоги с ароматическим радикалом. Величины констант диссоциации для этих аналогов почти не отличаются от соответствующих величин для АТР и АДР [5]. Это позволяло рассчитывать на высокую эффективность взаимодействия выбранных аналогов с креатинкиназой.

Действительно, исследование кинетики взаимодействия креатинкиназы из скелетных мышц кролика как с одним [7, 16], так и с другим реагентом [1] показало, что оно удовлетворяет всем критериям процесса аффинной модификации и оба реагента являются высокоэффективными аффинными реагентами для фермента. Оказалось, что оба аналога инактивируют креатинкиназу, причем существует стехиометрическое соответствие между уровнем ковалентного присоединения реагента к ферменту и степенью инактивации его: предельное число молей анало-

га, связавшегося с молем фермента, соответствует двум — числу активных центров фермента (рис. 1, 2); величины констант ингибирования как для алкилирующего реагента (5×10^{-5} М), так и для фотоактивного (8×10^{-5} М) свидетельствуют об их высоком сродстве к креатинкиназе; ингибирование фермента алкилирующим реагентом носит конкурентный

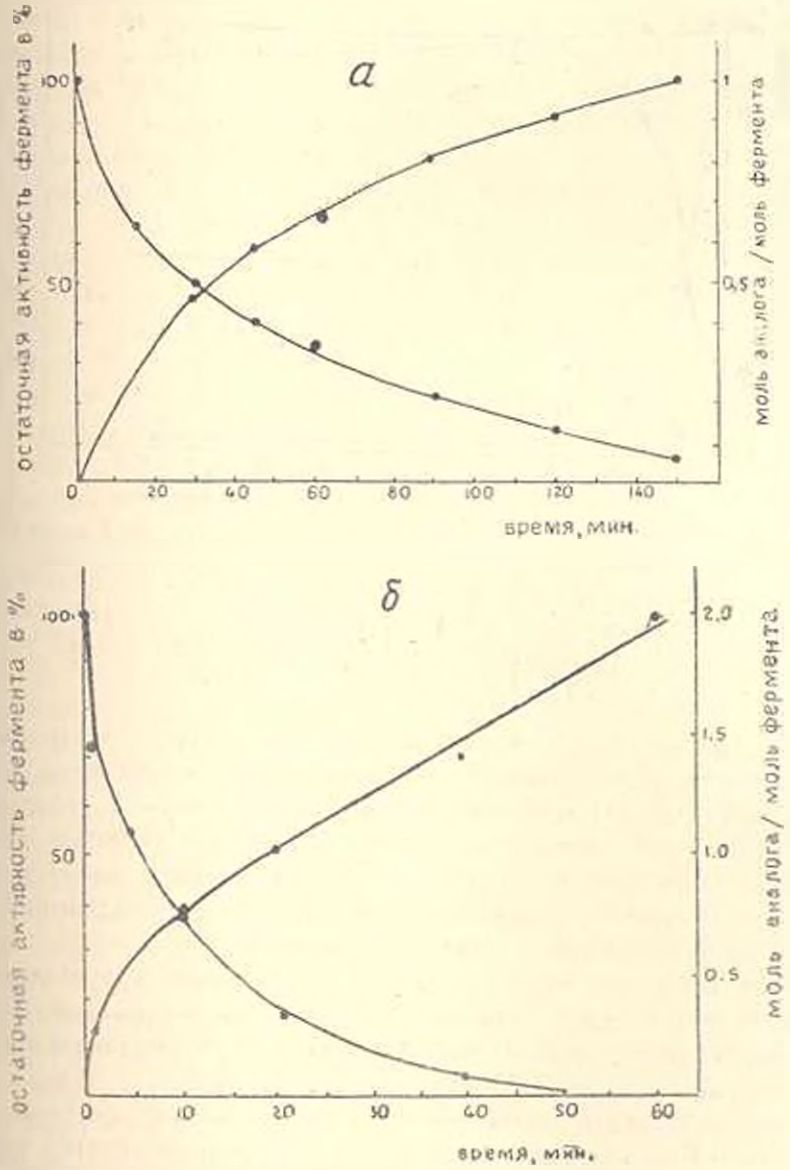

Рис. 1. Кинетические кривые инактивации креатинкиназы (1) в присутствии 4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)-бензил-γ-амида АТР в концентрациях 8×10^{-5} М (а), 4×10^{-4} М (б) и ковалентного присоединения аналога к ферменту (2); [E] — $2{,}5\times10^{-5}$ М; $[Mg(CH_3COO^-)_2]$ — 2×10^{-3} М.

характер, а фотоактивным — смешанный; субстраты креатинкиназы Mg-АТР, Mg-АДР, креатин защищают фермент от инактивирующего действия реагентов (рис. 2) [1, 7, 16].

Анализ полученных кинетических кривых выявил некоторые особенности механизма действия креатинкиназы. Оказалось, что субъединицы креатинкиназы ведут себя неидентично при взаимодействии с изученными реагентами. Из рис. 1 видно, что модификация алкилирующим ре-

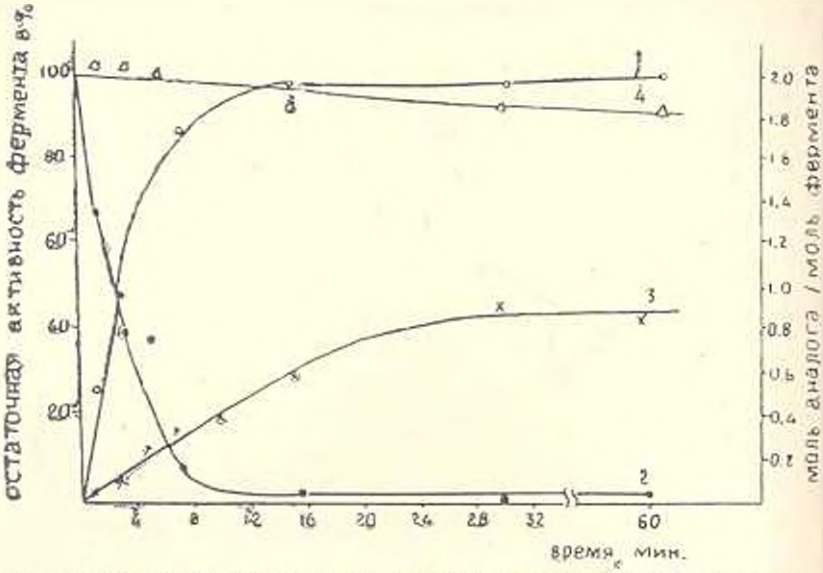

Рис. 2. Кинетические кривые инактивации креатинкиназы (2,4) и ковалентного присоединения γ-(р-азидоанилида) ^{14}С-АТР (1,3) в отсутствие и в присутствии Mg-АДР: [Е]—$9{,}1\times10^{-6}$ М; [азидо-АТР] — $1{,}2\times10^{-5}$ М; [$Mg(CH_3COO^-)_2$] — 1×10^{-3} М; 3,4 — в присутствии Mg-АДР. [Е] — $7{,}3\times10^{-6}$ М. [азидо-АТР] — $1{,}2\times10^{-5}$ М. [АДР] — $3{,}2\times10^{-6}$ М; [$Mg(CH_3COO^-)_2$] — 5×10^{-3} М.

агентом уже одной субъединицы ведет почти к полной потере активности фермента. При повышении концентрации этого реагента скорость модификации резко возрастает, модифицируются уже обе субъединицы, но при этом — с различной скоростью. Насыщение активных центров фермента реагентом приводит к полной инактивации креатинкиназы. Увеличение степени модификации при повышении концентрации реагента свидетельствует о различии в сродстве субъединиц к алкилирующему реагенту, что согласуется с тем фактом, что для креатинкиназы получены две разные величины констант ассоциации при взаимодействии ее с γ-ариламидами АТР и ε-АТР [8, 10], различающиеся в 3—10 раз.

При модификации креатинкиназы фотоактивным аналогом также наблюдается неравноценное поведение субъединиц фермента. Из рис. 2 видно, что одна субъединица фермента взаимодействует с реагентом с большей скоростью, чем другая, и ее модификация ведет к более глубокой инактивации фермента, чем модификация другой субъединицы. Исследование взаимодействия отдельных субъединиц креатинкиназы с γ-р-азидоанилидом АТР выявило эти различия. Оказалось, что в присутствии реагента активность М-субъединицы фермента уменьшается значительно быстрее и на значительно большую величину, чем актив-

ность при pH 5,0, соответствующая преимущественно M'-субъединице [28].

Различие в скоростях модификации M- и M'-субъединиц наблюдали и при исследовании взаимодействия креатинкиназы с флуоресцентными производными АТР [10]. Очевидно, что указанные различия связаны с различным сродством субъединиц фермента к изучаемым реагентам. Не исключается также, что реакционноспособные радикалы аналогов связываются коаналогично с различными по активности акцепторами в активных центрах субъединиц. Однако является ли это следствием исходной неравноценности субъединиц или результатом кооперативного взаимодействия их, пока не ясно.

Следует отметить, что в отличие от эфинных реагентов нуклеотидной природы с синтетическим аналогом креатина этоксикреатином, обе субъединицы креатинкиназы взаимодействуют с одинаковой скоростью [25]. Это означает, что гуанидинсвязывающие центры креатинкиназы равноценны и что связывание этоксикреатина с одной субъединицей не действует на связывание его с другой. В связи с последним следует отметить, что связывание гуанидиновых субстратов с ферментом вызывает, по-видимому, незначительные конформационные изменения в белке, которые не регистрируются имеющимися методами, тогда как связывание нуклеотидных субстратов, и особенно Mg-АДР, значительно изменяет конформацию фермента [26]. На отсутствие взаимодействия между гуанидинсвязывающими центрами указывают и результаты анализа кинетики действия фосфоциклокреатина на креатинкиназную реакцию. В то же время наблюдается синергизм между фосфоциклокреатином, с одной стороны, и только АТР или АТР и креатином – с другой, благодаря взаимозависимости связывания этих веществ с разными субъединицами димера креатинкиназы [14].

Данные о неравноценности субъединиц креатинкиназы были получены и в процессе изучения защиты фермента от инактивации природными субстратами—Mg-АДР и Mg-АТР, которые защищают креатинкиназу от инактивации как алкилирующим, так и фотоактивным реагентами [1, 7]. Из рис. 2 видно, что в присутствии Mg-АДР имеет место почти полная защита креатинкиназы от инактивации афинными реагентами. Mg-АТР защищает фермент значительно хуже. Аналогичный факт наблюдали при взаимодействии креатинкиназы с азидо-ε-АТР в присутствии нуклеотидных субстратов [10]. Такое различие в защитных эффектах, очевидно, обусловлено различием в комплексообразовании этих субстратов с ферментом. Хорошо известно, что креатинкиназа обладает примерно на порядок большим сродством к Mg-АДР, чем к Mg-АТР. Использование модифицированного с помощью азидо-ε-АТР препарата креатинкиназы для изучения процесса связывания нуклеотидных субстратов с ферментом выявило, что оно происходит в две стадии: ассоциации и более медленной изомеризации комплекса. И оказалось, что креатинкиназа обладает не только более высоким сродством к Mg-АДР, чем к Mg-АТР, но и в три раза большей скоростью изомеризации при комплексообразовании с АДР, чем с АТР [11]. Кроме того, неполная защита Mg-АТР может быть обусловлена образованием комплекса фермент—АТР—Mg-

азидо-АТР за счет дополнительных контактов ароматического заместителя азидо-АТР с активным центром, тем более что фосфоамидная связь в аналоге может имитировать N—P связь, присутствующую в креатинфосфате. Хорошо известно, что креатинфосфат, связываясь с тем же участком молекулы, что и креатин, способен, кроме того, конкурировать с АТР, благодаря перекрыванию концевых фосфатных групп креатинфосфата и АТР [27]. О возможности контакта аналога с участком связывания второго субстрата свидетельствует также ряд экспериментальных данных: малые значения K_i, смешанный тип ингибирования γ-р-(азидоанилидом) АТР креатинкиназы, частичная защита креатином от ковалентного присоединения γ-р-(азидоанилида ^{14}C)-АТР к ферменту [1], защита креатинфосфатом креатинкиназы от инактивации рядом алкилирующих аналогов нуклеотидной природы [20], а также защита нуклеотидными субстратами (Mg-АТР больше, чем Mg-АДР) креатинкиназы от инактивации эпоксикреатином [25]. Совокупность же этих данных указывает на то, что центры связывания нуклеотидных и гуанидиновых субстратов сближены в активном центре фермента, что обеспечивает линейный перенос фосфорила в ходе креатинкиназной реакции.

Из рис. 2 видно, что в присутствии Mg-АДР при практически полной защите креатинкиназы от инактивации наблюдается присоединение примерно одного моля γ-(р-азидоанилида)-АТР, из чего следует, что вклад одной из субъединиц в активность фермента невелик. Действительно, исследование свойств отдельных субъединиц показало, что АДР защищает от инактивации только М-субъединицу и лишь незначительно М'-субъединицу. В то же время активность М'-субъединицы в указанных условиях определения активности невелика, поэтому модификация почти не сказывается на активности фермента [28]. Эти данные еще раз свидетельствуют о разном сродстве двух субъединиц креатинкиназы к нуклеотидным субстратам и их производным.

Наши данные о функциональной неидентичности субъединиц креатинкиназы не единичны. В последние годы этому вопросу посвящен ряд работ, которые подробно обсуждались в предыдущем сообщении [19].

Недавно фотоаффинное мечение аргининкиназы и креатинкиназы γ-(р-азидоанилидом)-АТР исследовали Вандест и сотр. [30]. Представляет интерес, что фотоинактивированные аргининкиназа и креатинкиназа не способны были узнавать свои нуклеотидные субстраты, как показали дифференциальная спектроскопия и аффинная хроматография на сефарозе-АТР. В то же время показано, что флуоресцентные азидоаналоги АТР почти не влияют на нуклеотидсвязывающие свойства модифицированной с их помощью креатинкиназы [11].

Титрование SH-групп аргининкиназы и креатинкиназы, модифицированных γ-(р-азидоанилидом)-АТР при различных условиях, и некоторые другие данные свидетельствуют о том, что арилнитреновая часть фотоаналога ковалентно присоединяется к реактивной группе цистеинового остатка, присутствующего в области активного центра. Предпола-

гается, что этот цистеиновый остаток находится вблизи места локализации фосфатной цепи нуклеотидных субстратов [30].

Данные о топографии активного центра креатинкиназы были дополнены результатами исследования кинетики аффинной модификации креатинкиназы диальдегидными производными АТР и АДР, которые специфически блокируют ε-NH_2 группу остатка лизина в нуклеотидсвязывающих центрах фермента. Они свидетельствуют о том, что указанная группа в активном центре креатинкиназы локализована вблизи рибофуранозного цикла АДР и АТР при образовании последними комплексов с ферментом и, по-видимому, участвует в строгой ориентации полифосфатной цепочки нуклеотидов в каталитическом акте [17].

Алкилирующие аналоги нуклеотидных субстратов с модифицированной полифосфатной группировкой были использованы и при изучении топографии активного центра креатинкиназы из мышц щуки. Высказано предположение о существовании в активном центре фермента каталитической группы, имеющей природу имидазольного кольца гистидина [20].

Таким образом, исследование кинетики аффинного мечения креатинкиназы наглядно иллюстрирует возможности метода аффинной модификации. Использование изученных аффинных реагентов открывает широкие перспективы в плане исследования первичной структуры и топографии активного центра, вопросов неидентичности и взаимодействия субъединиц, механизма действия и регуляторных свойств креатинкиназы. Кроме того, высокая специфичность аналогов гуанидиновых субстратов по отношению к креатинкиназе может быть использована для исследования этого фермента in vivo.

Институт экспериментальной биологии
АН Армянской ССР.

Поступило 2 VI 1983 г.

ԿՐԵԱՏԻՆԿԻՆԱԶԱՅԻ ԿԱՌՈՒՑՎԱԾՔԸ, ԳՈՐԾՈՂՈՒԹՅԱՆ ՄԵԽԱՆԻԶՄԸ: ՖԵՐՄԵՆՏԻ ԱՖԻՆԱՅԻՆ ՓՈՓՈԽՈՒԹՅՈՒՆԸ: II

Լ. Ս. ՆԵՐՍԵՍՈՎԱ, Զ. Ս. ՄԿՐՏՉՅԱՆ, Մ. Գ. ՂԱԶԱՐՅԱՆՑ, Ժ. Ի. ՀԱԿՈՓՅԱՆ

Հոդվածում քննվում է ֆերմենտների աֆինային ձևափոխման մեթոդը։ Նշվում են այդ մեթոդի հիմնական սկզբունքները։ Ամփոփվում են կրեատինկինազայի աֆինային ձևափոխման վերաբերյալ փորձառական (սեփական և գրական) տվյալները։

STRUCTURE AND MECHANISM OF ACTION OF CREATINE KINASE. THE AFFINITY MODIFICATION OF THE ENZYME. II

L. S. NERSESOVA, Z. S. MKRTCHYAN, M. G. GAZARYANTS, Zh. I. AKOPYAN

The method of affinity modification of the enzymes is discussed. Experimental data on affinity modifications of creatine kinase are summarized.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Акопян Ж. И., Газарянц М. Г., Мкртчян З. С., Нерсесова Л. С., Лаврик О. И.* Биохимия, *46*, 262, 1981.
2. *Ахвердян В. З., Киселев Л. Л., Кнорре Д. Г., Лаврик О. И., Невинский Г. А.* ДАН СССР, *226*, 698, 1976.
3. *Бабкина Г. Т., Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г.* Биоорг. химия, 1, 611, 1975.
4. *Булычев Н. А., Лаврик О. И., Невинский Г. А.* Мол. биол., *109*, 13, 1980.
5. *Бунева В. Н., Горшкова И. И., Лаврик О. И., Мустаев А. А., Попов Р. А.* Мол. биол., *14*, 1308, 1980.
6. *Бунева В. Н., Кудряшова Н. В., Курбатов В. А., Романенко А. Г.* Биохимия, *43*, 2261, 1978.
7. *Газарянц М. Г., Мкртчян З. С., Нерсесова Л. С., Курбатов В. А., Кнорре Д. Г., Акопян Ж. И.* ДАН АрмССР, *66*, 160, 1978.
8. *Горшкова И. И., Лаврик О. И., Попов Р. А.* Биохимия, *46*, 1564, 1981.
9. *Гулаева Н. В., Вульфсон П. Я., Северин Е. С.* Биохимия, *43*, 373, 1978.
10. *Денисов А. Ю., Невинский Г. А., Лаврик О. И.* Биохимия, *47*, 184, 1982.
11. *Денисов А. Ю., Невинский Г. А., Лаврик О. И.* Биоорг. химия, *8*, 72, 1982.
12. *Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г., Курбатов В. А., Лебедев А. В., Самуков В. В., Шишкин Г. В.* Биоорг. химия, *7*, 793, 1975.
13. *Кочеткова М. В., Гулаев Н. Н., Туницкая В. Л., Северин Е. С.* Биохимия, *46*, 353, 1981.
14. *Куприянов В. В., Покасенко Н. А., Сакс В. А.* Биоорг. химия, *6*, 116, 1980.
15. *Мирсалихова Н. М., Баранова Л. А., Туницкая В. Л., Гулаев Н. Н.* Биохимия, *46*, 314, 1981.
16. *Мкртчян З. С., Нерсесова Л. С., Акопян Ж. И., Бабкина Г. Т., Бунева В. Н., Кнорре Д. Г.* Биохимия, *45*, 5806, 1980.
17. *Невинский Г. А., Газарянц М. Г., Мкртчян З. С.* Биоорг. химия, *9*, 457, 1983.
18. *Невинский Г. А., Денисов А. Ю.* Биоорг. химия, *7*, 1693, 1981.
19. *Нерсесова Л. С., Акопян Ж. И.* Биолог. ж. Армении, *36*, 809, 1983.
20. *Таваме Н.* Автореф. канд. дисс., Л., 1979.
21. *Ankilova V. N., Knorre D. G., Kravchenko V. V., Lavrik O. I., Nevinsky G. A.* FEBS Letters, *60*, 172, 1975.
22. *Budker V. G., Kozlov I. A., Kurbatov V. A., Miligram Ya. M.* FEBS Letters, *8* 11, 1977.
23. *Kochetkov S. N., Bulargina T. V., Sashcenco L. P., Severin E. S.* Eur. J. Biochem, *81*, 111, 1977.
24. *Knorre D. G., Kurbatov V. A., Samukov V. V.* FEBS Letters, *70*, 105, 1976.
25. *Marletta M. A., Kenyon G. L. J.* B. C., *254*, 1879, 1979.
26. *Mc. Laughlin A. C.* J. B. C., *249*, 1445, 1974.
27. *Morrisson J. F., Cleland W. W.* J. B. C., *241*, 673, 1966.
28. *Nevinsky G. A., Ankilova V. N., Lavrik O. I., Mkrtchyan Z. S., Nersesova L. S., Akopyan J. I.* FEBS Letters, *149*, 36, 1982.
29. *Severin E. S., Gulyaev N. N., Bulgarina T. V., Kochetkova M. N.* Adv. in Enzyme Reg., *17*, 251, 1979.
30. *Vandest P., Labbie J. P., Kassab R.* Eur. J. Biochem., *104*, 433, 1980.