

УДК 577.1

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

М. Г. Газарян, З. С. Мкртчян, Л. С. Нерсесова, В. А. Курбатов,  
 член-корреспондент АН СССР Д. Г. Кнорре, Ж. И. Акопян

Аффинное алкилирование креатинкиназы аналогом  
 субстрата—гамма—производным АТФ

(Представлено 30/1 1978)

Для изучения структурно-функциональных свойств активных центров ферментов важным инструментом исследований является метод аффинной модификации, основанный на сродстве фермента к аналогу субстрата или к эффектору, которые содержат активные группировки. Эти модифицирующие агенты, обладая структурными характеристиками, отвечающими пространственной геометрии активного центра, могут на первой стадии реакции связываться не ковалентно в области активного центра, а затем на второй стадии могут реагировать с функциональными группами активного центра. При этом необходимо, чтобы константа ассоциации модифицирующего агента, несущего активную группу, была близка к константе ассоциации немодифицированного субстрата. Ковалентное связывание модифицирующего агента с ферментом приводит к его необратимому ингибированию, которое можно предотвратить введением в реакционную среду субстрата.

Недавно был предложен простой метод получения гамма-амидов нуклеозидтрифосфатов, основанный на обработке аминами нуклеозид-5'-триметафосфатов, получаемых из нуклеозидтрифосфатов действием водорастворимого карбодимида в водном растворе (1) или дициклогексилкарбодимида в органических растворителях (2). Это открыло возможность получения производных нуклеозидтрифосфатов, несущих в гамма-положении реакционноспособную группу и, следовательно, потенциально пригодных для аффинной модификации нуклеозидтрифосфат-зависимых ферментов. Показано, что аналоги АТФ этого класса сохраняют сродство к аминоксил-тРНК-синтетазам и РНК-полимеразам, так как могут служить в первом случае конкурентными ингибиторами по отношению к АТФ (3), а во втором—субстратами соответствующих ферментов (4). Производные АТФ, содержащие ароматическую азидо-группу, оказались способными осуществлять аффинную модификацию ферми-

ляланил-тРНК-синтетазы из *E. coli* (5) и триптофанил-тРНК-синтетазы из поджелудочной железы быка (6).

В случае перечисленных выше ферментов АТФ выступает в качестве донора аденилата для образования аминокциладенилата или для включения в растущую цепь РНК. Представляло интерес выяснить способность аналогов этого типа осуществлять аффинную модификацию другой важной группы АТФ-зависимых ферментов—фосфотрансфераз, в которых АТФ выступает в качестве донора фосфата. С этой целью мы исследовали действие реакционноспособного алкилирующего производного АТФ-4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)-бензил-гамма-амида на один из важнейших представителей подкласса фосфотрансфераз-креатинкиназу (АТФ: креатин-фосфотрансфераза, КФ 2.7.3.2.1).

В работе использовали лиофилизированный препарат креатинкиназы из мышцы кролика производства фирмы «Реанал», Венгрия. Модифицирующий реагент—4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)-бензил-гамма-амид АТФ синтезирован по методу (7).

Активность фермента определяли по модифицированному методу (8). Метод основан на определении образующегося за 3 минуты креатина в реакционной смеси, содержащей 4 мкг фермента,  $7,6 \cdot 10^{-3}$  М ацетата магния,  $1,25 \cdot 10^{-3}$  М АДФ и  $2,3 \cdot 10^{-3}$  М креатинфосфата в 0,1М трис-НСl, рН 7,2 при 30°C. Отбираемые через определенные интервалы времени пробы (0,02 мл) вносили в реакционную смесь для определения активности фермента (фермент выдерживался с модифицирующим реагентом при 30°C).

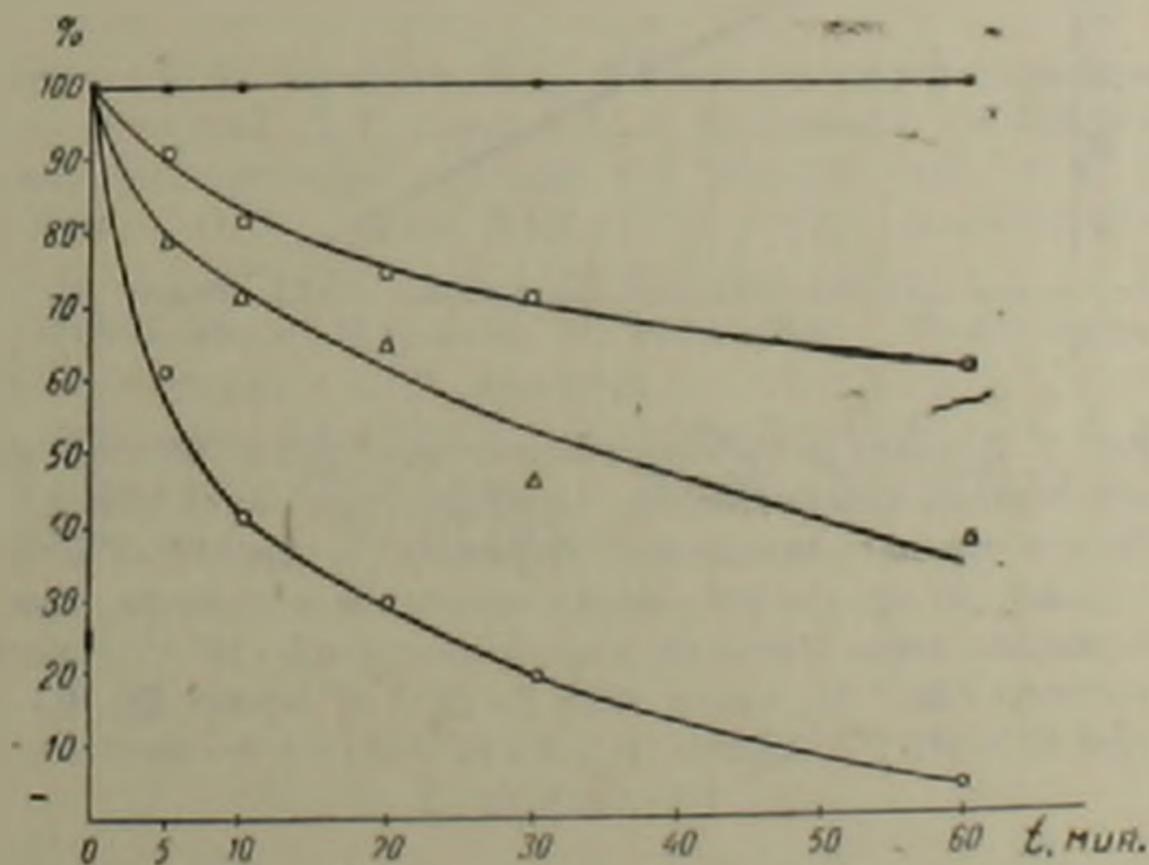


Рис. 1. Кинетика инактивации креатинкиназы алкилирующим аналогом АТФ. По оси ординат—активность фермента в процентах от начальной, по оси абсцисс—время инкубации в минутах. Инкубационная смесь состояла: креатинкиназа  $0,5 \cdot 10^{-3}$  М; ацетат магния  $2 \cdot 10^{-3}$  М; 0,1 М трис-НСl, рН 7,2 и аналог АТФ в концентрации 0 (●),  $0,5 \cdot 10^{-3}$  М (□),  $1 \cdot 10^{-3}$  М (Δ),  $2 \cdot 10^{-3}$  М (○)

На рис. 1 показана зависимость активности фермента от времени выдерживания с различными концентрациями алкилирующего реагента. В то время как активность фермента в отсутствие реагента остается неизменной в течение часа, в присутствии реагента происходит быстрая инактивация. При четырехкратном избытке реагента активность за час падает практически до нуля. Начальная скорость инактивации тем выше, чем больше исходная концентрация реагента. Отношение относительной начальной скорости к начальной концентрации реагента составляет для трех приведенных опытов 2, 1,5 и 1,5. Эти величины в пределах точности эксперимента совпадают. Таким образом, скорость инактивации пропорциональна начальной концентрации реагента. Эффективная константа скорости первого порядка для реакции инактивации ( $10^{-3} \text{ с}^{-1}$ ) по порядку величины близка к константе скорости лимитирующей стадии превращения реагента ( $4 \cdot 10^{-4} \text{ с}^{-1}$  при  $40^\circ\text{C}$  (<sup>2</sup>)). Это дает основание считать, что инактивация есть результат алкилирования фермента аналогом АТФ.

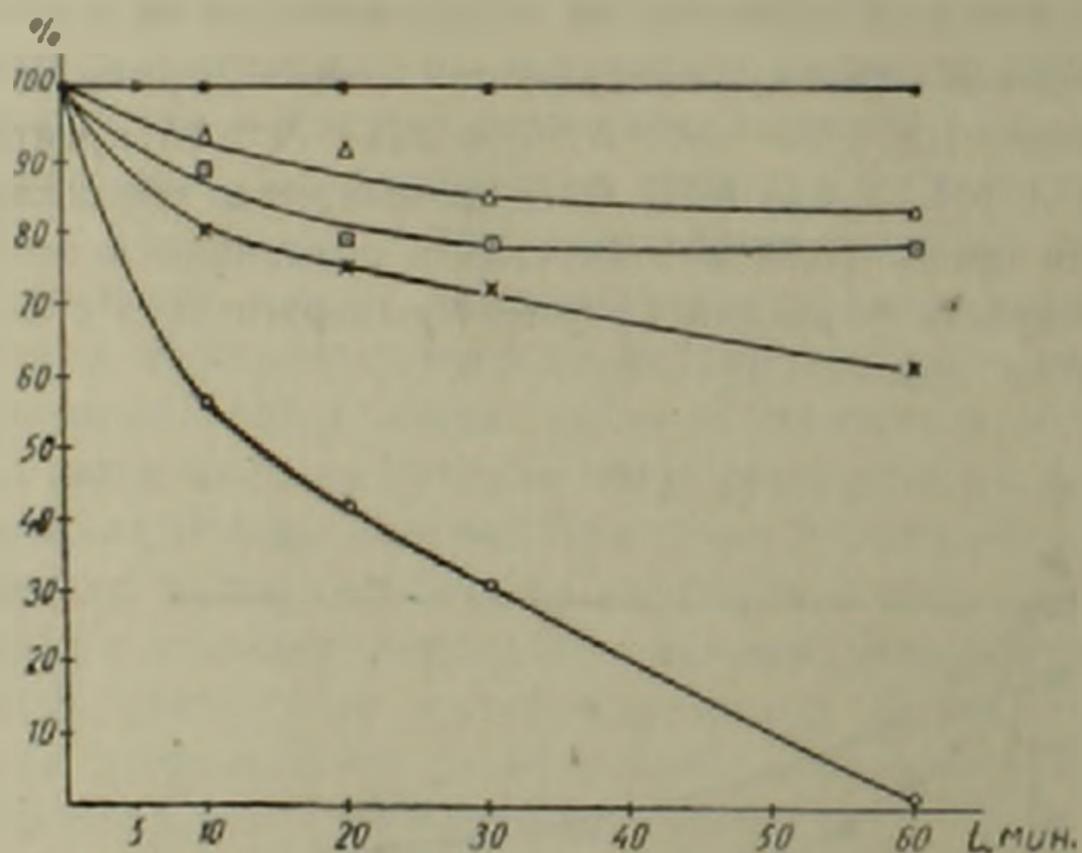


Рис. 2. Влияние различных концентраций АДФ на кинетику инактивации креатинкиназы алкилирующим аналогом АТФ. По оси ординат—активность фермента в процентах от начальной, по оси абсцисс—время инкубации в минутах. Инкубационная смесь состояла: креатинкиназа  $0,5 \cdot 10^{-5} \text{ М}$ , ацетат магния  $4 \cdot 10^{-3} \text{ М}$ , аналог АТФ  $2 \cdot 10^{-5} \text{ М}$  (кроме ●),  $0,1 \text{ М}$  трис-НСI pH 7,2: АДФ 0 (○),  $4 \cdot 10^{-4} \text{ М}$  (×),  $8 \cdot 10^{-4} \text{ М}$  (□),  $1,6 \cdot 10^{-3} \text{ М}$  (△)

На рис. 2 изображены кинетические кривые инактивации креатинкиназы при концентрации реагента  $2 \cdot 10^{-5} \text{ М}$  в присутствии различных концентраций субстрата АДФ. Видно, что присутствие АДФ в концентрациях порядка  $K_m$  тормозит процесс инактивации, т. е. АДФ конкурирует с алкилирующим аналогом за взаимодействие с ферментом. Это дает основание считать, что инактивация происходит за счет взаимо

действия аналога с участком связывания аденилового нуклеотида, т. е. за счет афинной модификации фермента.

Таким образом, производное АТФ, содержащее в гамма-положении алкилирующую группу, является высоко эффективным афинным реагентом для креатинкиназы.

Новосибирский государственный университет  
Институт экспериментальной биологии  
Академии наук Армянской ССР

Մ. Գ. ՂԱԶԱՐՅԱՆ, Ջ. Ս. ՄԿՐՏՉՅԱՆ, Լ. Ս. ՆԵՐՍԵՍՈՎԱ, Վ. Ա. ԿՈՒՐՐԱՅՈՎ, ՍՍՀՄ ԴԱ  
ՐԴՐԱԿԻԳ-ԱՆԳԱՄ Գ. Կ. ԿԵՈՐԵՆ, Ժ. Ի. ՀԱԿՈՐՅԱՆ

Կրեատինկինազի աֆինային ալկիլացումը սուրստրատի անալոզի՝ ԱՏՖ-ի  
զամմա ածանցյալի միջոցով

Ցույց է տրված կրեատինկինազի աֆինային ձևափոխման հնարավորու-  
թյունը: Որպես աֆինայի ձևափոխող ազենտ օգտագործված է ԱՏՖ-ի ալկի-  
լող զամմա-ածանցյալը: Ցույց է տրված ֆերմենտի ալտիլոթյան արգե-  
լակման աստիճանի և սուրստրատի անալոզի կոնցենտրացիայի խտության  
կախվածությունը, ինչպես նաև ԱՏՖ-ի տարրեր կոնցենտրացիաների ազդե-  
ցությունը ձևափոխող միացություն արդելակող գործունեության վրա:

#### ЛИТЕРАТУРА — ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

<sup>1</sup> Г. Т. Бабкина, В. Ф. Зарытова, Д. Г. Кнорре, Биоорганическая химия, т. 1, 611—  
615, 1975. <sup>2</sup> В. Ф. Зарытова, Д. Г. Кнорре, В. А. Курбатов, А. В. Лебедев, В. В. Саму-  
ков, Г. В. Шишкин, Биоорганическая химия, т. 1, 793—799, 1975. <sup>3</sup> Г. Т. Бабкина, Д. Г.  
Кнорре, В. Л. Кнорре, О. И. Лаврик, ДАН СССР, т. 216, 1165—1167 (1974). <sup>4</sup> М. А.  
Grachev, E. F. Zaychikov, FEBS Letters, 49, 163—166 (1974). <sup>5</sup> V. G. Budker, D. G.  
Knorre, V. V. Kravchenko, O. I. Laurik, G. A. Nevinsky, N. M. Teplova, FEBS Let-  
ters, v. 49, 159—162 (1974). <sup>6</sup> В. З. Ахвердян, Л. Л. Киселев, Д. Г. Кнорре, О. И.  
Лаврик, Г. А. Невинский, ДАН СССР, т. 226, 698—701 (1976). <sup>7</sup> D. G. Knorre, V. A.  
Kurbatov, V. V. Samukov, FEBS Letters, v. 70, 105—108 (1976). <sup>8</sup> A. H. Ennor, H.  
Rosenberg, Biochemical J., v. 57, 203 (1954).