



УДК 577.152.273'2'134:577.112.4

КРЕАТИНКИНАЗА ИЗ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ КРОЛИКА:  
ОБРАЗОВАНИЕ О-АЦИЛТИРОЗИНА В РЕЗУЛЬТАТЕ АКТИВАЦИИ  
КАРБОКСИЛЬНОЙ ГРУППЫ АКТИВНОГО ЦЕНТРА ФЕРМЕНТА  
ПОД ДЕЙСТВИЕМ АФФИННЫХ РЕАГЕНТОВ — ИМИДАЗОЛИДОВ  
НУКЛЕОТИДОВ

Невинский Г. А., Лаврик О. И., Газарян М. Г.\*,  
Мкртчян З. С.\*, Акопян Ж. И.\*

Новосибирский институт биоорганической химии СО Академии наук СССР;

\*Институт экспериментальной биологии Академии наук АрмССР, Ереван

С помощью имидазолидов AMP, ADP и ATP достигнута инактивация креатинкиназы из скелетных мышц кролика. Скорость инактивации M- и M'-форм фермента отличается примерно в 50–100 раз и замедляется в присутствии ADP и ATP. Разностный спектр препаратов нативного и модифицированного ферментов соответствует спектру N, O-диацетилтирозина. Кинетические кривые гидроксиламинзависимого разрушения N, O-диацетилтирозина и измененный разностный спектр модифицированного имидазолидами ANP и нативного фермента практически совпадают. Сделано предположение о том, что основной причиной инактивации белка является образование связи между активированной взаимодействием с Im-ANP карбоксильной группой активного центра фермента и оближенной с ней OH-группой остатка тирозина. Стехиометрия образования ацилтирозина оценена равной  $2,1 \pm 0,2$  моль на моль функционального димера. Наряду с образованием сложноэфирной связи между указанными остатками аминокислот происходит включение до 0,03–0,06 моль [ $^{14}\text{C}$ ]нуклеотидов на моль белка. Согласно данным кислотного гидролиза, Im-ATP блокирует  $\epsilon$ -аминогруппу остатка лизина, а Im-AMP — гуанидинцевую группу остатка аргинина. Обсуждаются причины множественности модификации креатинкиназы аффинными реагентами. Результаты работы и данные литературы обобщены с помощью схемы возможного расположения остатков различных аминокислот в активном центре креатинкиназы.

Креатинкиназа (ATP : креатин-N-фосфотрансфераза, КФ 2.7.3.2) осуществляет обратимый перенос фосфорильной группы от  $\text{Mg}^{2+} \cdot \text{ATP}$  на креатин. Димерный фермент имеет молекулярную массу 82 000 Да. Фермент из скелетных мышц кролика удалось разделить на две формы, названные M и M' [1, 2]. Одна из форм фермента катализирует реакцию фосфорилирования креатина с максимальной скоростью при pH 8,5–9,5, а обратную — при pH 7,5–8,0. Вторая форма проявляет максимальную активность в прямой реакции при pH 5,5–5,7, а в обратной — при pH 5,0 и меньше.

Ранее [1–7] для исследования креатинкиназы был использован ряд аффинных реагентов — химически активных аналогов нуклеотидов. Удобными для анализа участка связывания трифосфатной цепи ATP в активном центре фермента представлялись фосфорилирующие аналоги нуклеотидов, в которых фосфатная группа связана с атомом азота имидазольного кольца, — имидазолиды нуклеотидов. При помощи имидазолидов ATP, GTP и GMP в активном центре ДНК-зависимой РНК-полимеразы из *E. coli* были локализованы остатки гистидина и лизина [8–10]. В работе [11] было показано, что  $\gamma$ -имидазолиды dATP, dGTP и dGMP являются аффинными реагентами для ДНК-полимеразы I из *E. coli*. В данной работе исследована модификация креатинкиназы из скелетных мышц кролика имидазолидами AMP, ADP и ATP.

Инкубация креатинкиназы с имидазолидами AMP, ADP и ATP приводила к инактивации фермента. Как следует из работы [12] и совокупности

Сокращения: Im-AMP, Im-ADP, Im-ATP — имидазолиды AMP, ADP и ATP

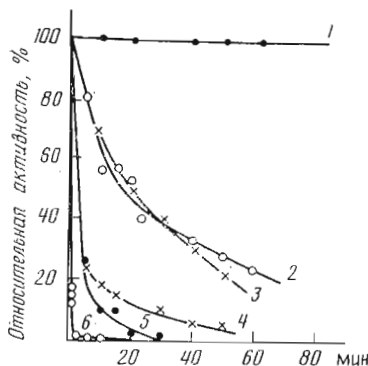


Рис. 1

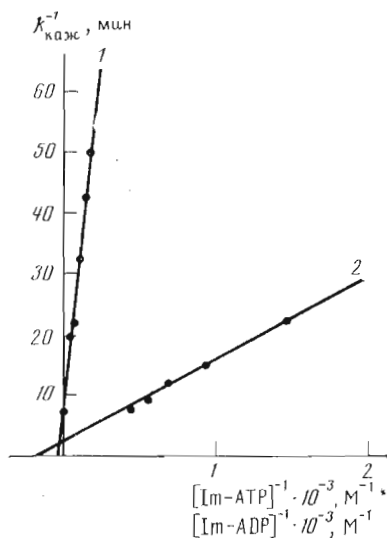


Рис. 2

Рис. 1. Инактивация формы М (1–3) и формы М' (4–6) креатинкиназы из скелетных мышц кролика имидазолидами АМР (4,8 мМ, 1 и 5), АДФ (1,0 мМ, 3 и 4) и АТР (1,2 мМ, 2 и 6) при 30° С. Активность отдельных М- и М'-форм фермента определяли по скорости «обратной» реакции при рН 8,5 и 5,0 соответственно

Рис. 2. Зависимость величин  $k_{наж}^{-1}$  инактивации формы М креатинкиназы при 30° С от концентрации Im-АТР (1) и Im-АДФ (2)

данных работ [1–7], фермент эффективно связывает нуклеотиды как в присутствии, так и в отсутствие ионов магния. Было обнаружено, что  $Mg^{2+}$  по-разному влияет на скорость модификации белка имидазолидами нуклеотидов. Он практически не влияет на скорость и глубину модификации креатинкиназы имидазолидами АМР и АТР и почти в два раза ускоряет инактивацию фермента имидазолидом АДФ. В связи с тем что  $Mg^{2+}$  в контрольных экспериментах способствовал стабилизации белка, описанные ниже эксперименты проведены в присутствии ацетата магния.

Известно [10], что реакционная способность имидазолидов нуклеотидов уменьшается с увеличением рН за счет депротонирования остатков имидазола, поэтому для уменьшения неспецифической модификации креатинкиназы этими реагентами без предварительного образования ими специфических комплексов с ферментом рН в инкубационной смеси поддерживали равным 8,5. Нуклеотиды и их аналоги эффективно взаимодействуют в этих условиях с обеими формами фермента [1–7, 12].

Для выявления вероятной разницы в модификации двух форм креатинкиназы аналогами нуклеотидов мы использовали возможность определять их активность при рН 8,5 и 5,0 соответственно [1, 2]. Из рис. 1 видно, что скорость модификации формы М' любым из имидазолидов нуклеотидов примерно в 50–100 раз выше, чем формы М. Обнаруженное отличие в скоростях модификации форм примерно в 10–20 раз больше, чем наблюдавшееся ранее (в 2–5 раз) при использовании других химически активных аналогов нуклеотидов [4–7].

Зависимости логарифма остаточной активности форм М и М' от длительности инкубации с имидазолидами АМР, АДФ и АТР при их различных концентрациях были линейными, что указывает на псевдопервый порядок реакции модификации фермента аналогами нуклеотидов.

Высокая скорость модификации формы М' фермента (при очень больших концентрациях аналогов ее активность снижалась за 5–20 с на 80–90%) не позволяла оценить начальные скорости необратимого ингибирования (инактивации) этой формы фермента в широком диапазоне концентраций аналогов. В связи с этим были исследованы зависимости скорости модификации белка при разных концентрациях реагента только

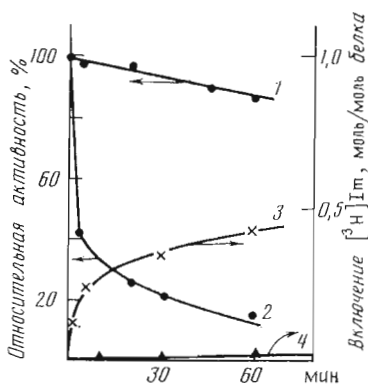


Рис. 3

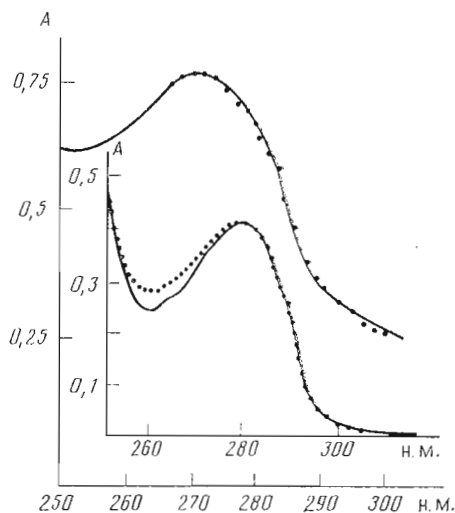


Рис. 4

Рис. 3. Кинетические кривые инактивации формы М (1) и формы М' (2) креатинкиназы из скелетных мышц кролика и накопления ковалентно связанного с белком  $[^3\text{H}]$ имидазола (3 и 4) при модификации фермента  $[^3\text{H}]$ Im-ADP (2,4 мМ). Количество метки, включенной в белок, определено после удаления избытка реагента гель-фильтрацией в отсутствие (4) и в присутствии (3) додецилсульфата натрия.

Рис. 4. Спектр УФ-поглощения диацетилтирозина (сплошная линия) и разностный спектр (точки) нативного препарата креатинкиназы из скелетных мышц кролика относительно модифицированного Im-ADP фермента в 0,1 М Hepes-NaOH-буфере, рН 8,5. На вставке показаны спектры УФ-поглощения нативного (точки) и модифицированного Im-ATP (сплошная линия) препаратов фермента в 0,05 М трис-HCl-буфере, рН 7,5. Использованы растворы белков, имеющие одинаковое поглощение при 280 нм.

для формы М. Из зависимости кажущихся констант скоростей инактивации ( $k_{\text{ин}}^{\text{каж}}$ ) формы М от концентрации Im-ADP или Im-ATP были рассчитаны величины  $K_d$  комплексов креатинкиназы с этими реагентами и константы максимальных скоростей инактивации фермента (рис. 2). Они оказались достаточно близкими:  $7 \pm 2$  и  $2 \pm 1$  мМ;  $0,4 \pm 0,1$  и  $0,3 \pm 0,1$  мин $^{-1}$  для Im-ATP и Im-ADP соответственно.

Добавление в инкубационные смеси при инактивации фермента имидазолидами нуклеотидов ATP или ADP в концентрациях, сравнимых с концентрациями реагентов, приводило к снижению скорости инактивации фермента в 1,5–5 раз. Защитный эффект нуклеотидов возрастал с увеличением их концентрации. Эти данные указывают в пользу аффинности процесса модификации фермента имидазолидами нуклеотидов.

Инактивация фермента имидазолидами нуклеотидов могла быть вызвана как фосфорилированием фермента с образованием ковалентной связи между фосфатной группой нуклеотида и белком, так и включением в белок остатка имидазола с образованием имидазolidов аспарагиновой и глутаминовой кислот. Одним из критериев аффинной модификации активных центров ферментов аналогами их субстратов является соответствие стехиометрии ковалентного присоединения реагентов числу активных центров, связывающих субстраты. Однако при использовании имидазolidов AMP, ADP или ATP, содержащих  $^{14}\text{C}$  в адениновом кольце, наблюдалось включение только 0,03–0,06 моль  $[^{14}\text{C}]$ нуклеотида на моль димера креатинкиназы при полной инактивации обеих форм белка. Удаление избытка реагента из препаратов модифицированного фермента гель-фильтрацией (при 25 или 4° С) не влияло на глубину инактивации фермента и уровень включения метки. В то же время образованная ковалентная связь была достаточно стабильной, так как метка не отщеплялась при инкубации модифицированного фермента в буферных растворах с рН 6–10, а активность фермента не восстанавливалась. В контрольных

экспериментах после инкубации белка с  $^{14}\text{C}$ -меченым AMP, ADP или ATP в пике белка при гель-фильтрации содержалось не более 2—3% метки от той, которая обнаружена в случае имидазолидов этих нуклеотидов. Эта метка полностью исчезала из пика белка при повторной гель-фильтрации фермента.

Для проверки альтернативного предположения, т. е. возможности образования ковалентной связи с остатком имидазола, был использован  $[^3\text{H}]\text{Im-ADP}$ , а в контрольных экспериментах —  $[^3\text{H}]\text{имидазол}$ . Как видно из рис. 3, при инактивации M'-формы фермента на 85% и M-формы на 15% ковалентное присоединение  $[^3\text{H}]\text{имидазола}$  не превышает 0,01 моль на моль димера. Таким образом, не наблюдается соответствия между уровнем ковалентного включения метки и глубиной инактивации фермента при использовании аналогов, меченных как по нуклеотидной части, так и по остатку имидазола.

Возможным объяснением полученных данных может быть образование промежуточных соединений аналогов с аминокислотными остатками фермента, которые способны к последующему взаимодействию со сближенными группами белка с отщеплением остатков реагента. Согласно результатам модификации креатинкиназы водорастворимым карбодимидом [13], предполагается наличие в нуклеотидсвязывающих участках фермента карбоксильных групп остатков Glu или Asp. В случае фосфорилирования карбоксильных групп этих остатков имидазолидами нуклеотидов следует ожидать образования смешанных ангидридов фосфорной и карбоновой кислот. Последние очень реакционноспособны и неустойчивы даже при нейтральных pH. Взаимодействие любого из возможных промежуточных соединений со стерически сближенной группой можно затормозить добавлением реагентов, нарушающих эту сближенность. В качестве такового мы использовали додецилсульфат натрия.

После достижения практически полной инактивации фермента под действием Im- $[^{14}\text{C}]\text{AMP}$  или Im- $[^{14}\text{C}]\text{ADP}$  к нему добавляли додецилсульфат натрия. Последующее удаление избытка реагента гель-фильтрацией при определении уровня ковалентного мечения белка также проводили в присутствии додецилсульфата натрия. Инактивации обеих форм фермента на 85—90% соответствовало присоединение 0,1—0,15 моль  $^{14}\text{C}$ -меченых нуклеотидов на моль димерного белка. Около половины обнаруженной радиоактивной метки исчезало из белка при повторной гель-фильтрации препаратов в буфере с pH 7—9, содержащем додецилсульфат натрия. Оставшаяся метка (0,03—0,06 моль/моль белка) была стабильной в нейтральных и слабощелочных условиях. Таким образом, ковалентная связь, образуемая между концевой фосфатной группой нуклеотидов и ферментом, является весьма лабильной и сравнимой по устойчивости со смешанными ангидридами фосфорной и карбоновой кислот [14]. Наряду с этим происходит небольшое мечение белка стабильной меткой. Степень включения в последнем случае не зависит от того, в присутствии или в отсутствие додецилсульфата натрия проводится ее определение.

При использовании Im-ADP, меченного  $^3\text{H}$  по остатку имидазола, добавление додецилсульфата натрия после достижения инактивации формы M' почти на 85% и формы M почти на 15% увеличивало уровень включения метки до 0,45 моль  $[^3\text{H}]\text{имидазола}$  на 1 моль димерного белка (рис. 3, кривая 3). Несмотря на более высокий уровень ковалентного присоединения метки, по-прежнему не наблюдается соответствия глубины инактивации и уровня ковалентного присоединения. Кроме того, как и при использовании  $^{14}\text{C}$ -метки (в основании нуклеотида) практически вся  $^3\text{H}$ -метка отщепляется от нативного фермента при гель-фильтрации в отсутствие додецилсульфата натрия. Таким образом, вероятнее всего как нуклеотидная, так и имидазольная часть аналогов после образования промежуточного соединения отщепляются от белка в ходе реакции инактивации фермента.

В связи с этим следует отметить, что в органической химии гетероциклических соединений неизвестна реакция образования амидной связи между имидазолом и карбоксильной группой карбоновых кислот без пред-

варительной активации последней [15]. Хотя такую реакцию между карбоксильной группой аминокислотного остатка и имидазольным циклом аналогов NTP в активном центре фермента полностью исключить нельзя, более вероятным, с нашей точки зрения, является другой путь имидазольной активации фермента. По-видимому, сначала происходит образование смешанного ангидрида фосфорной и карбоновой кислот, который затем ацилирует свободную молекулу имидазола с отщеплением нуклеотида.

Реакционная способность имидазолидов аспарагиновой и глутаминовой кислот должна быть близкой к таковой для ацетилимидазола, который изучали ранее Вилле и др. [16]. Ацетилимидазол активно ацилирует ОН-группы остатков тирозина и N-ацитилтирозина и применяется в качестве селективного химического реагента для модификации этих групп в белках. При образовании из N-ацитилтирозина N,O-диацетилтирозина поглощение белка в области 260–300 нм уменьшается. O-Ацетильная группа удаляется под действием  $\text{NH}_2\text{OH}$ . Используя изменение коэффициента молярного поглощения при 278 нм (при pH 8,5  $\Delta \epsilon_{278} = 1160 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ ) согласно данным работ [16, 17], можно определять количество ацетилированного тирозина в белке, обработанного ацетилимидазолом.

Как обсуждалось выше, карбоксильные группы фермента в присутствии имидазолидов нуклеотидов могут быть активированы путем образования либо ацилимидазола, либо ангидрида с фосфорной кислотой. В обоих случаях возможна реакция активированной таким образом карбоксильной группы со сближенной ОН-группой тирозина. Для проверки возможности модификации оксигруппы тирозина было исследовано изменение спектров креатинкиназы после ее полной модификации (утрата 95–100% активности обеими формами фермента) имидазолидами AMP, ADP и ATP. Как видно из рис. 4 (вставка), обработанный реагентом фермент поглощает при pH 7,5 в области 250–280 нм слабее, чем нативный белок. Аналогичные результаты были получены при модификации креатинкиназы Im-AMP и Im-ADP (как и в первом случае, сравнивались препараты фермента, имеющие одинаковое поглощение при 280 нм). Спектр N,O-диацетилтирозина (вид которого при pH 8,5 практически не отличается от спектра N-ацетилтирозина) и разностный спектр нативного фермента относительно модифицированной Im-ADP креатинкиназы (рис. 4) достаточно хорошо совпадают. Аналогичные результаты были получены при использовании имидазолидов AMP и ATP. Эти данные указывают на образование в активном центре фермента ацитилтирозина в результате реакции активированной карбоксильной группы со сближенной с ней ОН-группой тирозина.

Дополнительным подтверждением этого вывода является совпадение скоростей изменения поглощения при 270–280 нм растворов N,O-диацетилтирозина и модифицированных аналогами нуклеотидов препаратов фермента при их обработке  $\text{NH}_2\text{OH}$  в одинаковых условиях (рис. 5). Образование сложноэфирной связи между карбоксильной и оксигруппой активного центра фермента подтверждено данными разностного ИК-спектра препаратов нативного и модифицированного белка. В последнем случае появляется полоса в области  $1725 \text{ см}^{-1}$ , характерная для сложноэфирной связи фенола и карбоновых кислот [18]. Сравнение поглощения модифицированных препаратов белка при 278 нм до и после их обработки  $\text{NH}_2\text{OH}$ , а также разностных спектров препаратов нативного фермента относительно модифицированного имидазолидами нуклеотидов позволяло рассчитать, что стехиометрия образования ацитилтирозина (соответствующая 95–100% инактивации обеих форм фермента) равна  $2,1 \pm 0,2$  моль/моль функционального димера. Таким образом, модификация обеих форм фермента, несмотря на разницу в скоростях модификации, скорее всего, приводит к образованию одного и того же продукта — ацитилтирозина.

Как было показано выше, наряду с образованием «внутримолекулярных» сшивок имидазолиды нуклеотидов модифицируют креатинкиназу с образованием продуктов, стабильных при нейтральных и слабощелоч-

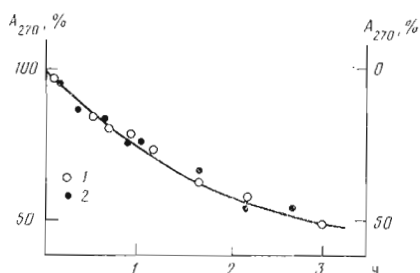


Рис. 5

Рис. 5. Кинетические кривые изменения поглощения N, O-диацетилтирозина (1, правая ось) и разностного поглощения при 270 нм нативной креатинкиназы относительно инактивированного Im-ADP препарата фермента (2, левая ось) при их обработке 80 мМ NH<sub>4</sub>OH в Hepes-NaOH-буфере, pH 8,5 (при 25° С). Использовали препарат фермента, в котором обе формы белка инактивированы на 95–100%

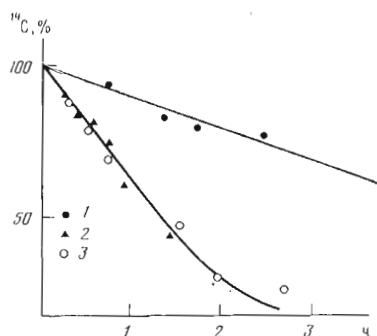


Рис. 6

Рис. 6. Кинетические кривые отщепления [<sup>14</sup>C]нуклеотидов, связанных ковалентно с креатинкиназой, при 37° С в 0,1 М триэтиламмоний-ацетатном буфере, pH 4,1, содержащем 0,1% додецилсульфат натрия. Фермент модифицирован Im-[<sup>14</sup>C]АТР (1), Im-[<sup>14</sup>C]АМР (2); 3 — гидролиз гуанидида dTMP в тех же условиях

ных pH. Характер образуемых стабильных связей может быть проанализирован путем отщепления ковалентной метки в условиях денатурации белка [8–10]. В указанных работах проведен анализ скоростей гидролиза ковалентных связей между фосфорильными группами NMP, NDP, NTP и различными соединениями, моделирующими остатки аминокислот. Кинетические кривые «демодикации» фермента при 37° С и pH 4,1 приведены на рис. 6. Согласно данным работ [8–10], скорость отщепления метки соответствует скорости гидролиза  $\gamma$ -(N-метиламида)АТР, свидетельствуя в пользу того, что  $\epsilon$ -аминогруппы остатков Lys являются акцептором  $\gamma$ -фосфата аналога АТР. Важные для активности креатинкиназы остатки Lys были выявлены ранее с помощью как группоспецифических [19], так и аффинных реагентов [4, 20]. В пользу возможности сближенности одного из остатков лизина с  $\gamma$ -фосфатом АТР при модификации фермента свидетельствуют данные работы [21], в которой с помощью метода ЯМР показано, что  $\epsilon$ -CH<sub>2</sub>-группа остатка Lys расположена вблизи формата (моделирующего  $\gamma$ -фосфат АТР) аналога комплекса переходного состояния: креатинкиназа · Mg<sup>2+</sup> · АDР · формат · креатин.

Скорость гидролиза ковалентной связи между нуклеотидной частью аналога и ферментом в случае его модификации Im-АМР (рис. 6) в наибольшей степени соответствует скорости гидролиза фосфамидной связи dTMP с гуанидинсоевой группой остатка аргинина. Эфиры и N-метиламиды нуклеозид-5'-монофосфатов практически не гидролизуются в использованных условиях [8, 10]. Скорость гидролиза имидазольных этих нуклеотидов примерно в 2–2,5 раза меньше [9, 10], чем скорость отщепления [<sup>14</sup>C]АМР от модифицированного фермента. В то же время кривые «демодикации» модифицированного фермента и гидролиза гуанидида с dTMP практически совпадают (рис. 6). На основании этих данных разумно предположить, что остаток аргинина сближен с  $\alpha$ -фосфатом АТР при образовании его комплекса с креатинкиназой. Возможен электростатический контакт этой группы нуклеотида с остатком аргинина. Предположение о наличии важного для каталитической активности креатинкиназы остатка Arg было высказано ранее на основании данных химической модификации фермента группоспецифическими реагентами [19].

Таким образом, в случае одного и того же реагента (имидазольные АТР и АМР) наблюдается образование двух типов ковалентных связей с белком: нестабильных, приводящих к промежуточным активированным соединениям, и стабильных — с остатками Lys и Arg. Объяснение этому следует искать в том, что взаимодействие аналога субстрата в основных

чертах отражает динамический характер взаимодействия субстрата с активным центром фермента. Узнавание ферментом субстрата обеспечивается, во-первых, многочисленными контактами, а во-вторых, динамическим изменением этих контактов в процессе формирования каталитически активного состояния. Например, в случае креатинкиназы обнаружено две стадии комплексообразования: ассоциация и более медленная изомеризация комплекса [7]. Это создает предпосылки для формирования набора комплексов реакционноспособного аналога субстрата с активным центром фермента. Поскольку в разных состояниях реализуются различные контакты, топография фермента с реакционноспособными аналогами может отличаться. Это обстоятельство обеспечивает как бы «подвижность» реакционноспособной группы, т. е. разнообразие стерических возможностей для атаки аналогом групп полимера. Не все возможности ковалентного присоединения могут быть реализованы. Очевидно, что это должно определяться как взаимной ориентацией реакционноспособной группы и аминокислотных акцепторов, так и их относительной реакционной способностью. В принципе могут быть и другие причины множественного ковалентного присоединения аффинных реагентов к ферментам: существование альтернативных активным центрам участков связывания субстрата; диффузия реагентов в ходе процессов ассоциации-диссоциации; направленные конформационные переходы, индуцируемые лигандами. Однако в рассматриваемом случае преимущественная модификация имидазольным АТР карбоксильной группы по сравнению с остатком лизина, скорее всего, определяется большей реакционной способностью этой группы в выбранных условиях. При pH 8,5 карбоксил является более сильным нуклеофилом, чем первичная аминогруппа лизина (величины  $pK$  этих групп в белках изменяются соответственно в диапазонах 2–5 и 8–11 [22]).

Множественность аффинной модификации была продемонстрирована ранее при анализе пептидных карт фенилаланил-тРНК-синтазы, модифицированной аналогом АТР, удовлетворяющим всем критериям аффинности модификации [23]. В случае РНК-полимеразы, по-видимому, связывание различных промоторов приводит к разным конформационным изменениям активного центра фермента, поскольку в зависимости от структуры промотора изменяется соотношение продуктов модификации остатков лизина и имидазольного кольца гистидина при инактивации фермента Im-GMP [8, 9].

Особый интерес представляет анализ роли OH-группы тирозина в протекании реакций, катализируемых креатинкиназой. При переносе фосфорильной группы на креатин должна происходить атака атома фосфора конечного фосфата АТР депротонированной аминогруппой креатина. Имидазольное кольцо остатка гистидина в этой реакции играет роль акцептора протона гуанидиниевого субстрата, а  $\epsilon$ -аминогруппа остатка Lys, скорее всего, фиксирует конечный фосфат АТР и увеличивает реакционную способность атома фосфора за счет оттягивания электронов. В обратной реакции должна происходить атака атома фосфора креатинфосфата атомом кислорода конечного фосфата ADP. Роль  $\epsilon$ -аминогруппы остатка Lys в этой реакции, скорее всего, сводится к фиксации и увеличению реакционной способности фосфата молекулы креатинфосфата. Допустим, что OH-группа остатка Tyr локализована вблизи  $\beta$ -фосфата молекулы АТР и образует водородную связь с его атомом кислорода. Поскольку в прямой реакции  $\beta$ -фосфат АТР не принимает непосредственного участия, а в обратной реакции атом кислорода именно этого фосфата атакует атом фосфора гуанидиниевого субстрата, образование рассматриваемой водородной связи может в меньшей степени влиять на прямую, чем на обратную реакцию. В результате образование сложной связи между OH-группой Tyr и карбоксилем фермента может приводить к меньшей инактивации киназы, измеренной с помощью прямой реакции, чем с помощью обратной.

Из кинетических кривых инактивации M-субъединицы белка для прямой и обратной реакций, катализируемых ферментом (рис. 7), видно, что

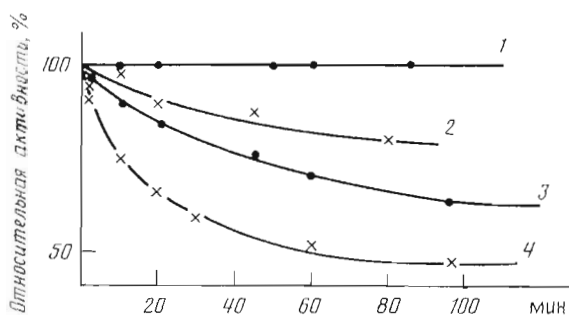


Рис. 7. Кинетические кривые инактивации M-формы белка Im-ADP в разных концентрациях, найденные с помощью прямой (1 и 3) и обратной (2 и 4) реакций, катализируемых этой формой фермента. Определенные активности фермента в прямой и обратной реакциях проводили при pH 8,5

скорость инактивации, найденная в первом случае, меньше, чем во втором. Это может указывать в пользу сделанного предположения об образовании водородной связи между OH-группой остатка тирозина и атомом кислорода  $\beta$ -фосфата ADP или ATP.

Рассмотренные данные указывают на отсутствие образования ковалентных интермедиатов при протекании реакции обратимого переноса фосфорильной группы между нуклеотидными и гуанидиниевыми субстратами, поскольку образование ковалентных связей между ферментом и нуклеотидами ведет к инактивации белка. Этот вывод подтверждает сделанное ранее предположение [24] об ассоциативном механизме переноса фосфорильной группы в случае креатинкиназы без образования промежуточных ковалентных продуктов реакции.

Ранее на основании исследования зависимостей скоростей киназной реакции от pH среды и аффинной модификации фермента эпоксикреатином сделано предположение о возможной локализации карбоксильной группы в участке связывания гуанидиниевой группы креатина [25, 26]. Очевидно, что эпоксикреатин, с одной стороны, а водорастворимый карбонимид и имидазолиды нуклеотидов — с другой, модифицируют различные карбоксильные группы активных центров креатинкиназы.

На основании ряда данных для креатинкиназы: модификации остатков триптофана (2-оксинитробензил)сульфонилбромидом [27]; влияния ATP на флуоресценцию остатков триптофана [28], изменения интенсивности спектров флуоресценции остатков триптофана после введения в белок аффинной метки с помощью  $\gamma$ -(*n*-азидоанилида) $\epsilon$ -ATP [6–7] — можно предположить, что основания нуклеотидных субстратов вступают во взаимодействие типа стекинга с ароматическим кольцом остатка Trp.

Наличие остатка имидазола вблизи участка связывания гуанидиниевой группы креатина следует как из работы по исследованию pH-зависимостей химических сдвигов C2-протонов имидазольного кольца остатков гистидина методом ЯМР-спектроскопии [25], так и из данных по модификации имидазольного кольца аналогом ATP — производным азотистого иприта [3].

Совокупность рассмотренных выше литературных данных по химической модификации креатинкиназы группоспецифическими реагентами была обобщена ранее в ряде работ [24, 29] с помощью схемы возможного расположения остатков различных аминокислот в активном центре креатинкиназы. С помощью метода аффинной модификации в настоящее время подтверждены некоторые из этих данных, а также получена новая информация о локализации отдельных остатков аминокислот в активном центре креатинкиназы. Совокупность этих результатов обобщена на рис. 8.

В настоящее время для исследования роли отдельных остатков аминокислот в активных центрах ферментов широко используют подход, основанный на их направленной замене на другие аминокислотные остатки



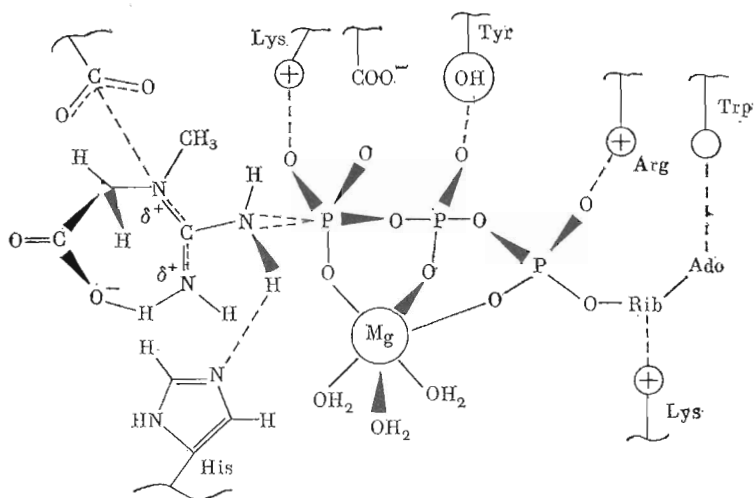


Рис. 8. Гипотетическая схема расположения остатков аминокислот активного центра креатинкиназы относительно нуклеотидного и гуанидиневого субстратов. На схеме обобщены результаты данной работы и литературные данные

с помощью методов генной инженерии. Недостатком метода аффинной модификации по сравнению с обсуждаемым подходом является то, что при мечении белка в активный центр фермента вводится объемная группа. В данной работе впервые обнаружена возможность проведения направленной химической реакции между остатками активного центра фермента с выбросом объемного аффинного реагента. В связи с этим следует полагать, что рассмотренный вариант аффинной модификации представляется перспективным для детального исследования роли аминокислотных остатков активных центров белков.

### Экспериментальная часть

В работе использовали гомогенные, судя по данным электрофореза в ПААГ, препараты креатинкиназы из скелетных мышц кролика, полученные согласно [2]. Соотношение M- и M'-форм найдено равным 1:1. Удельная активность фермента составляла 400 мкв Н<sup>+</sup>/мг белка за 1 мин [2].

АТФ, АДР, АМР, креатин, креатинфосфат (Reanal, Венгрия), Нерес, N,N-дициклогексилкарбодимид, дополнительно очищенный имидазол (Serva, ФРГ), 2,2'-дипиридилдисульфид (Merck, ФРГ), трифенилфосфин (Chemapol, ЧССР), трис (Олайн, СССР), дважды перекристаллизованный из воды, сефадекс G-25, тонкий (Pharmacia, Швеция), <sup>14</sup>C-меченые АМР, АДР и АТФ с удельной радиоактивностью соответственно 1,84; 2,0 и 1,9 ГБк/ммоль, [<sup>3</sup>H]Н<sub>2</sub>O с удельной радиоактивностью 17 мКи/ммоль («Изотоп», СССР). Остальные реактивы были квалификации ос. ч. и х. ч.

<sup>3</sup>H-Меченый имидазол получали из [<sup>3</sup>H]Н<sub>2</sub>O и имидазола нагреванием их смеси в 3 н. щелочи при 130°С согласно [15].

N,O-Диацетилтирозин синтезировали из тирозина согласно [17].

*Im-ATP* синтезировали в соответствии с работой [11], а *Im-ADP* (также при помощи дициклогексилкарбодимида) — согласно [8–10]. *Im-AMP* синтезировали при помощи 2,2'-дипиридилдисульфида и трифенилфосфина согласно работам [9, 10] с некоторыми модификациями. Очистку всех имидазолидов проводили методом ТСХ на пластинках Kieselgel 60F<sub>254</sub> (Merck, ФРГ) в системе диоксан — вода — конц. аммиак (6:3:1) при 4°С. Продукты элюировали с силикагеля водой, подщелоченной до pH 10,5–11 при помощи триэтиламина, освобожденной от примесей других аминов. Растворы продуктов использовали сразу же после их получения. В этом случае имидазолиды нуклеотидов были гомогенными, судя по данным ТСХ и ионообменной хроматографии. Они содержали не более 1% примесей исходных нуклеотидов.

*Гуанидид dTMP* получали при помощи реакции переамидирования N-метилимидазолида dTMP, синтезированного по методике, описанной

в работе [30]. К раствору 5 мкмоль N-метилимидазолида dTMP в 0,1 мл абс. диметилформамида добавляли 100 мкмоль триэтиламина и 25 мкмоль гуанидингидрохлорида. Смесь инкубировали в течение 30 мин при 25° С. Затем осадок соли триэтиламмония удаляли центрифугированием, а надосадочную жидкость добавляли по каплям к 20 мл абс. диэтилового эфира. Выпавший осадок целевого продукта отделяли центрифугированием и растворяли в 0,1 мл воды, подщелоченной триэтиламино до pH 11. Очистку продукта проводили по методике, описанной выше для имидазолидов нуклеотидов. Выход гуанидида dTMP составлял 30–40%. Продукт был гомогенным, судя по данным ТСХ и хроматографии с использованием DEAE-целлюлозы DE-41 (Whatman, Англия) в системе Томлинсона — Тенера (градиент концентрации калий-фосфатного буфера, pH 7,5, содержащего 7 М мочевины). Элюирующие концентрации буфера для гуанидида dTMP и свободного dTMP были равны соответственно 0,01 и 0,025 М. Величина  $R_f$  для гуанидида dTMP при ТСХ превышала таковую для dTMP примерно в 2 раза. Гуанидиновая группа гуанидида dTMP реагирует с  $\alpha$ -нафтолом и диацетилом (метод описан ниже для креатина) с образованием красной окраски. Гуанидин и dTMP входят в состав продукта в соотношении 1:1. Количество гуанидининовых групп в составе гуанидида dTMP определяли колориметрически при 520 нм с использованием калибровочной кривой, построенной по креатину, а dTMP — спектрофотометрически при 266 нм. УФ-спектры dTMP и гуанидида dTMP практически одинаковы. Кинетические кривые гидролиза гуанидида dTMP в 0,1 М триэтиламмоний-ацетатном буфере, pH 4,1, содержащем 0,1% додецилсульфата натрия, при 37° С получены с использованием метода хроматографии (см. выше).

*Активность фермента в прямой реакции* (фосфорилирование креатина) определяли потенциометрически при 30° С и непрерывном перемешивании. Реакционная смесь объемом 2 мл содержала 50 мМ креатин, 20 мМ ацетат магния, 1 мМ дитиотреит, 0,1 мМ EDTA, 0,1 М ацетат натрия и 20 мМ АТР. О начальной скорости реакции судили по расходу 0,01 н. NaOH за первые 1–2 мин, поддерживая в реакционной смеси pH 8,5.

*Активность фермента в обратной реакции* (перенос фосфорильного остатка от креатинфосфата на ADP) определяли колориметрическим методом [1]. Реакционная смесь объемом 0,15–0,3 мл содержала 15 мМ креатинфосфат, 5–10 мМ ADP, 15–30 мМ ацетат магния, 0,1 М буфер и 0,1–0,3 мкг/мл креатинкиназы. При определении активности отдельных форм фермента (M- и M'-форм) использовали соответственно HEPES-NaOH-буфер, pH 8,5, и натрий-ацетатный буфер, pH 5,0. После инкубации смеси в течение 1 мин при 30° С реакцию останавливали добавлением 0,2 мл щелочной смеси (приготовлена согласно [1]), содержащей 1%  $\alpha$ -нафтола, а затем 0,1 мл 2,5% раствора диацетила. Смесь разбавляли водой до 2–6 мл. Количество образовавшегося креатина измеряли колориметрически при 520 нм.

*Модификацию креатинкиназы* имидазолидами AMP, ADP и АТР проводили при 30° С в смеси объемом 0,1–2,0 мл, содержащей фермент (0,3–3,0 мг/мл), 50–100 мМ HEPES-NaOH-буфер, pH 8,5, один из имидазолидов нуклеотидов (0,1–100 мМ) и трехкратный по отношению к суммарной концентрации нуклеотидов и их аналогов избыток ацетата магния (в отдельных опытах смеси не содержали  $Mg^{2+}$ ). При исследовании защитного действия AMP, ADP и АТР их добавляли в 2–10-кратном избытке по отношению к аналогам. В процессе инкубации в аликвотах определяли активность фермента и степень ковалентного присоединения [ $^{14}C$ ]нуклеотидных или [ $^3H$ ]имидазольной меток. При остановке реакции модификации додецилсульфатом натрия его добавляли в реакционную смесь до конечной концентрации 0,1%. Смеси подвергали гель-фильтрации через сефадекс G-25 для удаления избытка реагента. За элюцией белка и низкомолекулярных лигандов следили по поглощению при 280 нм. Элюат, соответствующий пику белка, собирали по каплям на бумажные диски, которые высушивали, и содержание радиоактивной метки определяли с использованием толуольного сцинтиллятора. В качестве

контроля использовали препараты фермента, инкубированные в тех же условиях с [ $^{14}\text{C}$ ]нуклеотидами (или [ $^3\text{H}$ ]имидазолом). Количество радиоактивной метки, ковалентно присоединенной к ферменту, во всех случаях рассчитывали как разницу радиоактивности белка, модифицированного аналогом, и белка контрольных проб. При этом содержание радиоактивной метки в пиках белка, инкубированного с  $^{14}\text{C}$ -мечеными AMP, ADP, ATP или  $^3\text{H}$ -меченым имидазолом, не превышало 2–3% от количества метки в случае их химически активных аналогов. Это указывало на отсутствие реакции между ферментом и нуклеотидами.

*УФ-спектры регистрировали* на спектрофотометре Specord M-40 (Carl Zeiss, Jena, ГДР) в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 0,2–1,0 см при 25°С. Спектры нативного и модифицированного аналогами нуклеотидов фермента регистрировали после удаления избытка реагентов гель-фильтрацией через сефадекс G-25, уравновешенный 0,05 М трис-HCl-буфером, pH 7,5, или Hepes-NaOH-буфером, pH 8,5. Уменьшение поглощения белка в процессе его модификации имидазолидами нуклеотидов демонстрировали при помощи разностных спектров: в контрольной кювете содержался раствор исходного фермента, а в кювете сравнения — модифицируемый фермент. Реакционная смесь для инактивации креатинкиназы (кювета сравнения) содержала: 0,05–0,1 М Hepes-NaOH-буфер (pH 8,5), 6–30 мМ ацетат магния, креатинкиназу (3–4  $\text{OE}_{230}/\text{мл}$ ), 2–50 мМ Im-AMP (Im-ADP или Im-ATP). В контрольную кювету с исходным ферментом добавляли те же компоненты, но вместо имидазолида нуклеотида соответствующий свободный нуклеотид в той же концентрации. Реакцию инактивации начинали добавлением имидазолидов нуклеотидов (сразу же после добавления аналога регистрировали разностный спектр). После достижения максимально возможной инактивации фермента (в некоторых случаях для этого смесь инкубировали при 37°С) и прекращения изменения разностных спектров в обе кюветы добавляли нейтральный раствор  $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{H}_2\text{SO}_4$  до конечной концентрации 70–100 мМ. Смесь инкубировали до прекращения изменения разностных спектров белка. При оценке образования ацилтирозина использовали коэффициент молярного поглощения креатинкиназы  $\epsilon_{230} = 7,4 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$  [31] и ацилтирозина  $\Delta\epsilon_{238} = 1160 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$  [16]. При расчете концентрации ацилтирозина, образовавшегося после модификации белка имидазолидами нуклеотидов, использовали максимальное изменение его поглощения при 278 нм по разностным спектрам как до добавления, так и после добавления  $\text{NH}_2\text{OH}$ . Стехиометрия образования сложноэфирной связи, найденная при помощи двух последних подходов, была практически одинаковой. В итоге стехиометрию образования ацилтирозина рассчитывали как среднее из шести величин (два эксперимента для каждого из имидазолидов нуклеотидов).

*Восстановление активности креатинкиназы* после ее модификации имидазолидами нуклеотидов исследовали следующим образом. Аликвоты модифицированного и исходного препаратов фермента с заранее найденной относительной активностью подвергали гель-фильтрации через сефадекс G-25, уравновешенный натрий-ацетатным буфером, pH 6,0; трис-HCl-буфером, pH 5–8,0, или Hepes-NaOH-буфером, pH 8,0–9,5. Сразу после гель-фильтрации, а также после инкубации опытного и контрольного препаратов белка в течение 1–6 ч при 30 или 37°С повторно определяли их относительную активность. Было обнаружено, что оба препарата фермента в использованных условиях практически не изменяют своей активности.

*Демодификацию модифицированных препаратов креатинкиназы* (отщепление [ $^{14}\text{C}$ ]нуклеотидной метки) проводили при 37°С согласно работам [8–10]. Реакционная смесь объемом 0,2–2,0 мл содержала 0,1 М триэтиламмоний-ацетатный буфер (pH 4,1), 0,1% додецилсульфата натрия и модифицированный фермент. Количество метки, связанной с белком, определяли методом гель-фильтрации через сефадекс G-25, уравновешенный 0,05 М Hepes-NaOH-буфером, pH 8,0, содержащим 0,01% додецилсульфата натрия.

Величины  $k_{\text{нак}}$  инактивации фермента при фиксированных концентрациях аналогов находили при помощи зависимости логарифма остаточной активности фермента от времени. Величины  $K_a$  комплексов и константы максимальных скоростей инактивации фермента оценивали графически из зависимостей обратных величин  $k_{\text{нак}}$  от концентрации аффинного реагента согласно методу Китса — Уилсона [32, 33]. Ошибка в определении величин  $k_{\text{нак}}$  от концентрации не превышала 30%.

Разностные ИК-спектры препаратов нативной и модифицированной Im-ADP креатинкиназы регистрировали с помощью спектрометра Perkin — Elmer 325 (США). Спектры снимали с используемым KBr, концентрация белков была равна 0,25%.

Авторы глубоко признательны академику Д. Г. Кнорре за полезные обсуждения, постоянный интерес и поддержку работы.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Nevinsky G. A., Ankilova V. N., Lavrik O. I., Mkrtchyan Z. S., Nersesova L. S., Akopyan J. I. FEBS Lett., 1982, v. 149, № 1, p. 36—40.
2. Невинский Г. А., Анкилова В. Н., Лаврик О. И., Мкртчян З. С., Нерсесова Л. С., Акопян Ж. И. Биохимия, 1983, т. 48, № 2, с. 339—349.
3. Невинский Г. А., Газарянц М. Г., Лаврик О. И. Биоорган. химия, 1984, т. 10, № 5, с. 656—665.
4. Невинский Г. А., Газарянц М. Г., Мкртчян З. С., Лаврик О. И. Биоорган. химия, 1983, т. 9, № 4, с. 487—495.
5. Невинский Г. А., Денисов А. Ю. Биоорган. химия, 1981, т. 7, № 11, с. 1693—1700.
6. Денисов А. Ю., Невинский Г. А., Лаврик О. И. Биохимия, 1982, т. 47, № 2, с. 184—190.
7. Денисов А. Ю., Невинский Г. А., Лаврик О. И. Биоорган. химия, 1982, т. 8, № 1, с. 72—79.
8. Grachev M. A., Mustaev A. A. FEBS Lett., 1982, v. 137, № 1, p. 89—94.
9. Грачев М. А., Лукханов Е. А., Мустаев А. А. Биоорган. химия, 1986, т. 12, № 8, с. 1079—1087.
10. Grachev M. A., Kolocheva T. I., Lukhtanov E. A., Mustaev A. A. Eur. J. Biochem., 1986, v. 160, № 1, p. 1—9.
11. Невинский Г. А., Доронин С. В., Лаврик О. И. Биополимеры и клетка, 1985, т. 1, № 5, с. 247—253.
12. Бунева В. Н., Горшкова И. И., Лаврик О. И., Мустаев А. А., Попов Р. А. Молекуляр. биология, 1980, т. 14, № 6, с. 1308—1312.
13. Невинский Г. А., Газарянц М. Г. Биоорган. химия, 1987, т. 13, № 4, с. 498—505.
14. Cassio D., Lemoine F., Waller J.-P., Sandrin E., Boissonnas R. A. Biochemistry, 1967, v. 6, № 3, p. 827—836.
15. Джоуль Д., Смир Г. Основы химии гетероциклических соединений. М.: Мир, 1975, с. 326—350.
16. Шибата К. Доступность для реагентов и окружение аминокислотных остатков в нативных белках. В кн.: Новые методы анализа аминокислот, пептидов и белков/Ред. Овчинников Ю. А. М.: Мир, 1974, с. 344—353.
17. Simpson R. T., Riordan J. F., Valle B. L. Biochemistry, 1963, v. 2, № 1, p. 616—620.
18. Казарица Л. А., Куллерская Н. Б. Применения УФ- и ЯМР-спектроскопии в органической химии. М.: Высшая школа, 1971, с. 243.
19. Bickerstaff G. F., Price N. C. Int. J. Biochem., 1978, v. 9, № 1, p. 1—8.
20. Невинский Г. А., Вгорушина И. А., Булычев Н. П., Ковалева Г. К., Лаврик О. И. Молекуляр. биология, 1984, т. 18, № 5, с. 1316—1319.
21. James T. L., Cohn M. J. Biol. Chem., 1974, v. 249, № 9, p. 2599—2604.
22. Ферш Э. Структура и механизм действия ферментов. М.: Мир, 1980, с. 167.
23. Ходырева С. Н., Сычева Е. В., Анкилова В. Н., Лаврик О. И. Молекуляр. биология, 1984, т. 48, № 5, с. 1316—1319.
24. Кочетков С. П., Габитов А. Г., Северин Е. С. Биоорган. химия, 1984, т. 10, № 10, с. 1301—1325.
25. Cook P. F., Kenyon G. L., Kleland W. W. Biochemistry, 1981, v. 20, № 5, p. 1204—1220.
26. Marletta M. A., Kenyon G. L. J. Biol. Chem., 1979, v. 254, № 6, p. 1879—1886.
27. Zhou H. M., Tsou Ch.-L. Biochim. et biophys. acta, 1985, v. 830, № 1, p. 59—63.
28. Vasak M., Nagoyama K., Wütrich K., Mertens M. L., Kagi J. H. R. Biochemistry, 1979, v. 18, № 3, p. 5050—5056.
29. Kenyon G. L., Reed G. H. In: Advances in enzymology and related areas of molecular biology/Ed. Müster A. New York Chichester Brisbane, Toronto — Singapore: John Wiley and Sons, 1983, v. 54, p. 367—426.
30. Годовикова Т. С., Зарытова В. Ф., Халимская Л. М. Биоорган. химия, 1986, т. 12, № 4, с. 475—481.
31. Milner-White E. J., Watts D. S. Biochem. J., 1971, v. 122, № 5, p. 727—740.
32. Kitz R., Wilson J. B. J. Biol. Chem., 1962, v. 234, № 10, p. 3245—3249.

**CREATINE KINASE FROM RABBIT SKELETAL MUSCLE: FORMATION OF  
O-ACYLTYROSINE AS A RESULT OF ACTIVATION OF CARBOXYL GROUP  
OF THE ENZYME ACTIVE CENTRE BY THE ACTION OF AFFINITY REAGENTS,  
NUCLEOTIDE IMIDAZOLIDES**

NEVINSKY G. A., LAVRIK O. I., GAZARYANTZ M. G.\*, MKRTCHYAN Z. S.\*,  
AKOPYAN J. I.\*

*Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Branch of the Academy  
of Sciences of the USSR, Novosibirsk; \*Institute of Experimental Biology,  
Academy of Sciences of the Armenian SSR, Yerevan*

Creatine kinase from skeletal muscle (EC 2.7.3.2) was inactivated by means of imidazolides of AMP, ADP, ATP. Rates of the inactivation of the enzyme's M- and M'-subunits differ 50-100 fold and decrease in the presence of ADP and ATP. Differential spectrum of the native and modified enzymes corresponds to the spectrum of N,O-diacetyltyrosine. Kinetic curves of hydroxylamine-dependent destruction of N,O-diacetyltyrosine and of alteration of differential spectrum of the modified and native enzymes essentially coincide. The enzyme's inactivation appears to be caused mainly by the formation of a bond between nucleotide imidazolides activated carboxyl group of the active centre and OH-group of Tyr residue arranged in the close proximity. The stoichiometry of acyltyrosine formation is evaluated as  $2,1 \pm 0,2$  mole per mole of the functional dimer. Along with formation of ester bond between amino acid residues, a covalent attachment of 0,03-0,06 mole of [ $^{14}\text{C}$ ]nucleotides per mole of enzyme is observed. As the data of acid hydrolysis show, Im-ATP and Im-AMP block  $\epsilon$ -amino group of Lys and guanidine group of Arg, respectively. Reasons of the multiple modification of creatine kinase by affinity reagents are discussed. The results obtained and literature data are summarised in the hypothetical scheme of disposition of various amino acid residues in the active centre of creatine kinase.