



ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

УДК 577.159.02

КИНЕТИКА И МЕХАНИЗМ РЕАКЦИЙ, КАТАЛИЗИРУЕМЫХ АМИНОАЦИЛ-тРНК — СИНТЕТАЗАМИ

Малыгин Э. Г.

*Всесоюзный научно-исследовательский институт
молекулярной биологии, Новосибирск*

Киселев Л. Л.

Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва

Исследованы и установлены характеристики механизма реакции образования аминоксил-тРНК путем детального кинетического анализа, основанного на применении статистических методов оценки достоверности гипотез о механизме, использовании аналогов субстратов, а также химически модифицированных форм ферментов. Использован также новый метод кинетического анализа сложных реакций по отношению скоростей образования различных продуктов.

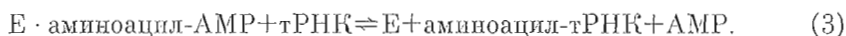
1. Введение

Несмотря на значительное расширение круга исследуемых вопросов в молекулярной биологии последних лет интерес к одной из центральных реакций в системе биосинтеза белков — образованию аминоксил-тРНК — устойчиво повышается. Для установления механизма этой реакции необходимо решить ряд задач, из которых наиболее фундаментальной является объяснение замечательной точности функционирования аминоксил-тРНК-синтетаз, которые в сложной смеси десятков конкурирующих субстратов с высокой эффективностью отбирают аминокислоты и тРНК с одинаковой кодовой принадлежностью и катализируют образование специфических аминоксил-тРНК, что в конечном счете обеспечивает безошибочность белкового синтеза [1, 2].

После открытия тРНК и аминоксил-тРНК-синтетаз удалось довольно быстро установить суммарную схему реакции



и ее основные стадии:



Получение высокоочищенных препаратов синтетаз и тРНК позволило приступить к изучению детального механизма реакции, которое было начато с установления порядка присоединения субстратов к ферменту [3, 4] по процедуре, разработанной Клеландом [5]. Этот подход был слишком формальным, поскольку не учитывались свойства аминоксил-тРНК-синтез, обнаруженные позднее. Большинство из исследованных ферментов оказались функциональными димерами, имеющими субъединичную либо доменную структуру, в которой имеет место сложное взаимодействие активных центров, зависящее от присутствия в них того или иного субстрата [1-3, 6, 7]. Наиболее существенный результат исследований последних лет — утверждение взгляда на аминоксил-тРНК-синте-

тазы как на ферменты, обладающие кооперативными свойствами и проявляющие «реакционную способность половины мест» (half-of-the-sites-reactivity) [3, 7–9]. Из этого следует, что адекватное описание их кинетического поведения должно основываться на достаточно сложных схемах реакций.

Исследуя кинетический механизм реакций образования аминоктил-тРНК, мы использовали несколько взаимодополняющих подходов:

1) количественное сопоставление различных гипотез о механизме действия аминоктил-тРНК-синтетаз с экспериментальными данными при помощи специальных статистических процедур;

2) анализ реакций, катализируемых синтетазами, по отношению скоростей образования различных продуктов;

3) сравнение кинетических свойств нативного и химически модифицированных (одноцентровых) препаратов фермента.

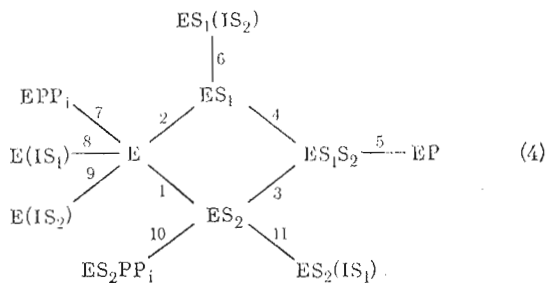
Основным объектом исследований были триптофанил-тРНК-синтетаза из поджелудочной железы быка, фенилаланил-тРНК-синтетаза из дрожжей и лейцил-тРНК-синтетаза из *E. coli*. При обсуждении результатов мы привлекаем данные по другим аминоктил-тРНК-синтетазам с целью выявить наиболее общие и устойчивые их свойства.

2. Порядок связывания низкомолекулярных субстратов с триптофанил- и фенилаланил-тРНК-синтетазами

Подход, использованный нами, состоял в одновременном применении двух методов: кинетического анализа в присутствии ингибиторов и статистической обработки полученных данных, развитой для так называемого последовательного планирования эксперимента [10]. Такой подход позволяет извлечь больше информации из экспериментальных данных для выбора наиболее адекватной гипотезы из семейства возможных механизмов реакции [11].

Для установления порядка связывания низкомолекулярных субстратов с синтетазами исследовали кинетику зависимого от аминокислоты АТР — [³²P]пирофосфатного обмена, который протекает по суммарному уравнению 2. Введение в реакционную систему структурных аналогов аминокислоты или АТР позволяет эффективнее дискриминировать возможные гипотезы о механизме реакции [12].

Зависимость начальной скорости обмена от концентрации АТР (S_1), аминокислоты (S_2), пирофосфата (PP_1) и ингибитора (I), полученную из измерений, можно сопоставить с кинетическими уравнениями, соответствующими ряду возможных механизмов изотопного обмена. Общая схема реакции в присутствии ингибиторов, аналогов аминокислоты и АТР содержит целый набор возможных механизмов, которые могут быть разделены на три класса в зависимости от стадий, участвующих в продуктивном маршруте реакции (схема 4): I — субстраты связываются с ферментом в порядке S_1S_2 (стадии 2 — 4 — 5), II — в порядке S_2S_1 (стадии 1 — 3 — 5), III — субстраты присоединяются в случайном порядке (оба маршрута). Остальные различия между механизмами относятся к наличию или отсутствию тех или иных тупиковых комплексов.



P — аминокиладенилат; IS_1 — аналог АТР; IS_2 — аналог аминокислоты.

2.1. Порядок связывания триптофана и АТР
с триптофанил-тРНК-синтетазой

Для статистической обработки использовали 216 экспериментов по измерению зависимости скорости АТР — [³²P]пирофосфатного обмена от концентраций реагентов: АТР, триптофана, триптамина и пирофосфата. На первом этапе с экспериментальными данными сопоставляли три механизма, среди которых два соответствуют определенному порядку связывания субстратов (механизмы I и II) и один — случайному порядку (механизм III). Механизм I включает стадии 2, 4–7, механизм II — стадии 1, 3, 5, 9 и механизм III — стадии 1–7, 9, 10 (схема 4). Уравнения скорости для рассматриваемых механизмов были получены с помощью методов стационарных графов [13, 14].

Сначала для сопоставления кинетических моделей с совокупностью экспериментальных данных использовали три критерия:

$$1) \quad F_i = \sum_{i=1}^N \left(\frac{v_i - \hat{v}_{i1}}{v_i} \right)^2$$

$$2) \quad \varepsilon_i = \frac{1}{N - n_i} \sum_{i=1}^N \left| \frac{v_i - \hat{v}_{i1}}{\hat{v}_{i1}} \right| \cdot 100 \quad (5)$$

$$3) \quad S_i = \sum_{i=1}^N (v_i - \hat{v}_{i1})^2$$

где v_i — экспериментально измеренная скорость реакции в i -м опыте, \hat{v}_{i1} — величина скорости, вычисленная для условий i -го опыта по уравнению для i -го механизма, n_i — число независимых параметров, входящих в уравнение для i -го механизма.

Как видно из табл. 1, минимальные значения этих критериев не столь различаются, чтобы с уверенностью отдать предпочтение одной из гипотез.

Использованные критерии представляют собой интегральные характеристики точности описания и, следовательно, недостаточно чувствительны к типу уравнений скорости, описывающих разные механизмы. Более чувствительным критерием является апостериорная вероятность гипотезы [10]. Вероятность $P_{i, r+1}$ каждой гипотезы после учета результатов $(r+1)$ -го эксперимента можно рассчитать с помощью рекуррентного выражения

$$P_{i, r+1} = \frac{P_{i, r} \cdot \varphi_{i, r+1}}{\sum_{j=1}^m P_{j, r} \cdot \varphi_{j, r+1}}, \quad (6)$$

где i — номер гипотезы, m — число гипотез, $\varphi_{j, r+1}$ — функция правдоподобия j -й гипотезы в условиях $(r+1)$ -го опыта [15]. В начале шаговой процедуры вычисления полагают, что все рассматриваемые гипотезы имеют равную вероятность $1/m$.

Результаты вычислений вероятностей механизмов реакции приведены в табл. 1. Вероятность механизма I (АТР, триптофан) приближается к 1, в то время как вероятность остальных механизмов падает практически до нуля. Расчеты по опытам, в которых отсутствовал ингибитор, не привели к достаточному расхождению значений вероятностей трех гипотез. Из этого ясна важность использования ингибиторных аналогов для достоверной дискриминации гипотез.

Значения ϵ_i %, F_i , S_i и P для различных кинетических моделей функционирования триптофанил-ТРНК — синтетазы

Механизм	ϵ_i %	F_i	S_i	P
I	7,2	2,1	24	1
II	11,1	4,3	52	10^{-18}
III	9,1	3,1	45	10^{-20}

Таким образом, в реакции изотопного обмена АТР с [32 P]пирофосфатом, катализируемой триптофанил-ТРНК—синтетазой из поджелудочной железы быка, имеет место определенный порядок присоединения субстратов к ферменту: первым присоединяется АТР, вторым — триптофан.

Те же экспериментальные данные были обработаны с привлечением большего числа возможных механизмов [16]. Оказалось, что наиболее вероятным по-прежнему является механизм с упорядоченным присоединением субстратов (АТР, триптофан), в котором, однако, образуются тупиковые комплексы фермента с триптофаном и триптамином (стадии 1, 9 на схеме 4). Одинаковый результат для большой и малой совокупностей гипотез показывает возможность последовательного уточнения схемы реакции при уже выбранном порядке присоединения субстратов.

2.2. Порядок связывания субстратов с триптофанил-ТРНК—синтетазой при замене триптофана на его аналог

Изучение АТР—[32 P]пирофосфатного обмена в присутствии реакционноспособного аналога истинного субстрата полезно в двух отношениях. Если последовательность присоединения субстратов не изменилась, это служит подтверждением исходной посылки в использовании ингибиторов для кинетического анализа, которая состоит в том, что структурные аналоги взаимодействуют с теми же ферментными формами, что и истинный субстрат. Кроме того, ценную информацию дает сравнение параметров реакций с участием истинного субстрата и аналога. Изменение в кинетических параметрах стадий должно согласовываться с установленным механизмом реакции [17].

Используя для расчетов экспериментальные данные по АТР—[32 P]пирофосфатному обмену в присутствии аналога истинного субстрата *L*-6-фтортриптофана (6-F-Trp), мы установили, что кинетический механизм реакции остается прежним, т. е. АТР присоединяется к ферменту первым, а 6-F-Trp — вторым [18]. При замене триптофана на 6-F-Trp константы, характеризующие взаимодействие с ферментом АТР, PP_i и триптамимина, изменились незначительно. В то же время параметры связывания аминокислоты, а также кинетические характеристики стадий, идущих с участием комплекса фермент—аминокислота, отличаются значительно для триптофана и его фторированного аналога. Это подтверждает, что АТР связывается с ферментом независимо от аминокислоты и может рассматриваться как первый субстрат в реакционной последовательности. Из изложенных результатов следует также, что кинетические измерения с субстратным аналогом и расчеты параметров можно использовать для дополнительного подтверждения порядка связывания субстратов.

2.3. Кинетический механизм [32 P]АТР— PP_i -обмена, катализируемого дрожжевой фенилаланил-ТРНК—синтетазой

Описанный подход мы применили к фенилаланил-ТРНК—синтетазе из дрожжей, отличающейся от триптофанил-ТРНК—синтетазы по специфичности и субъединичной структуре [19]. Такое сопоставление полезно в плане поиска общих и различающихся характеристик ферментов этого

Значения $\varepsilon_i\%$ и P для различных кинетических моделей функционирования фенилаланил-тРНК-синтетазы

Механизм	$\varepsilon_i\%$	P	Механизм	$\varepsilon_i\%$	P
I	24,4	—	IV	18,2	2
II	26,3	—	V	18,6	0
III	18,3	98			

класса. Для статистической обработки использовали 400 экспериментов. Аденозин и фенилаланинол, как показано, являются конкурентными ингибиторами в отношении АТР и фенилаланина.

Как и ранее, были рассмотрены три основные гипотезы (схема 4). Из табл. 2 видно, что средняя относительная ошибка ($\varepsilon_i\%$) для механизмов I и II значительно превышает экспериментальную, которая равна 17%. Это позволило нам исключить оба упорядоченных механизма как основные маршруты для АТР-РР₁-обмена, катализируемого фенилаланил-тРНК-синтетазой. Для механизма III ошибка описания близка к экспериментальной. Следовательно, в данном случае порядок субстратного связывания можно установить по простому статистическому критерию $\varepsilon_i\%$ в отличие от триптофанил-тРНК-синтетазы, где пришлось вычислять относительную вероятность гипотез.

После того как был показан случайный порядок присоединения субстратов к фенилаланил-тРНК-синтетазе, мы рассмотрели дополнительно два варианта этой гипотезы. В гипотезе IV стадия 3 принята очень медленной, так что основная часть пирогосфата превращается в [³²P]АТР через стадии 5-4-2. В гипотезе V принята медленной стадия 4; следовательно, превращение пирогосфата в АТР идет через стадии 5-3. Для выбора наиболее вероятного механизма вычислены относительные вероятности гипотез III, IV и V (табл. 2). Наибольшую вероятность (98%) получил механизм III, в котором эффективны оба маршрута. Малая, но значимая вероятность гипотезы IV может указывать на то, что часть экспериментальных данных (например, при большом соотношении концентраций АТР/фенилаланин) лучше описывается механизмом, начинающимся со связывания АТР с фенилаланил-тРНК-синтетазой.

Любопытно, что фенилаланил-тРНК-синтетазы из других источников также связывают субстраты случайно [20-22], в то время как триптофанил-тРНК-синтетазы связывают первым АТР [12, 16, 23]. Эти две группы ферментов различаются по субъединичной структуре ($\alpha_2\beta_2$ и α_2 соответственно). Предстоит выяснить, какова структурная основа для проявления синтетазами, играющими одинаковую роль в биосинтезе белков, разных кинетических механизмов.

3. Анализ реакций, катализируемых аминоксил-тРНК-синтетазами, по отношению скоростей образования различных продуктов

Для установления механизма сложных ферментативных реакций целесообразно исследовать концентрационную зависимость отношения скоростей образования различных продуктов. В случае аминоксил-тРНК-синтетаз можно регистрировать одновременное образование аминоксил-тРНК и [³²P]АТР, возникающей за счет изотопного обмена между АТР и меченым пирогосфатом. Таким образом, анализу подлежит отношение v_{aa}/v_{pp} , где v_{aa} — скорость образования аминоксил-тРНК, а v_{pp} — скорость АТР-пирогосфатного обмена. Рассмотрим в качестве примера одну из

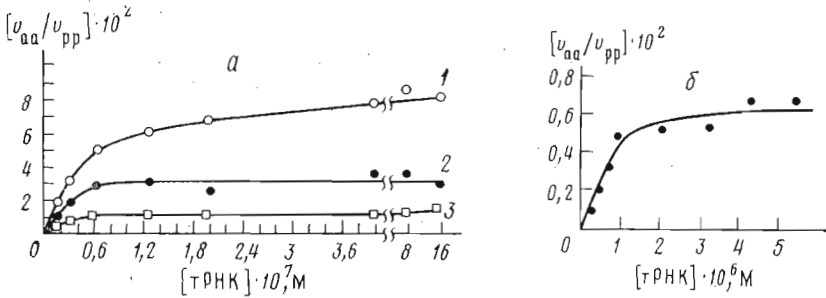
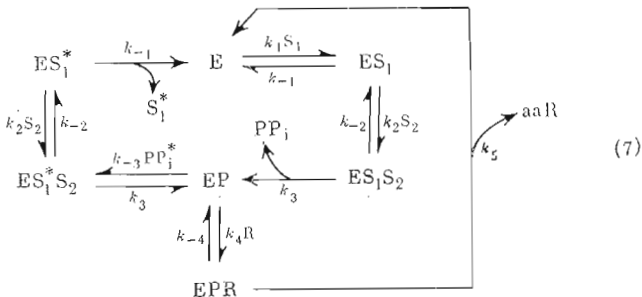


Рис. 1. Зависимость отношения скоростей аминоацелирования и пирофосфатного обмена от концентрации тРНК а) Leu-тРНК – синтетаза; концентрации компонентов реакционной смеси: Leu 7,5 мкМ, фермент 0,2 мкг/мл, АТР 2 мМ, [³²P]пирофосфат 40 (1), 75 (2), 150 мкМ (3). б) Trp-тРНК – синтетаза; концентрации компонентов реакционной смеси: Trp 24 мкМ, АТР 7,5 мМ, фермент 4,1 мкг/мл, [³²P]пирофосфат 0,4 мМ

возможных схем реакции:



S₁ – АТР, S₂ – аминокислота, PP_i – пирофосфат, Р – аминокислораденилат, R – тРНК, aaR – аминоацил-тРНК. Звездочкой отмечены продукты, меченные радиоактивным фосфором.

Скорость освобождения аминоацил-тРНК определяется превращением EPR → E, а скорость пирофосфатного обмена – ES₁^{*} → E. Кинетические уравнения для данных скоростей в этой схеме весьма сложны. В то же время отношение обеих скоростей простым образом зависит от концентрации пирофосфата, аминокислоты и тРНК:

$$v_{aa}/v_{pp} = \frac{k_4 R}{k_{-3} PP_i} \left(1 + \frac{k_3}{k_{-2}} \left(1 + \frac{k_2 S_2}{k_{-1}} \right) \right) / \left(1 + \frac{k_{-1}}{k_3} \right). \quad (8)$$

Для ряда возможных схем реакции уравнения отношения скоростей являются характеристическими, что может быть положено в основу дискриминации гипотез о механизме реакции [24].

Мы исследовали экспериментальные зависимости отношения указанных скоростей от концентраций субстратов и продуктов для лейцил- и триптофанил-тРНК-синтетаз [24, 25]. В зависимости v_{aa}/v_{pp} от концентрации тРНК есть два главных характеристических признака: точка пересечения кривой с ординатой и форма кривой. Для обеих аминоацил-тРНК-синтетаз кривая отношения скоростей возрастает от нуля при повышении концентрации до постоянной величины (рис. 1). Характер первой фазы зависимости свидетельствует в пользу того, что реакции АТР-PP_i-обмена и образования аминоацил-тРНК имеют общее промежуточное соединение – аминокислораденилат [26–29]. Двухфазность кривой показывает, что в реакции образования аминоацил-тРНК имеются по меньшей мере две реакционные последовательности, в которых возможен АТР-PP_i-обмен. В одной из этих последовательностей участвуют ферментные формы, не содержащие тРНК, в другой – содержащие тРНК.

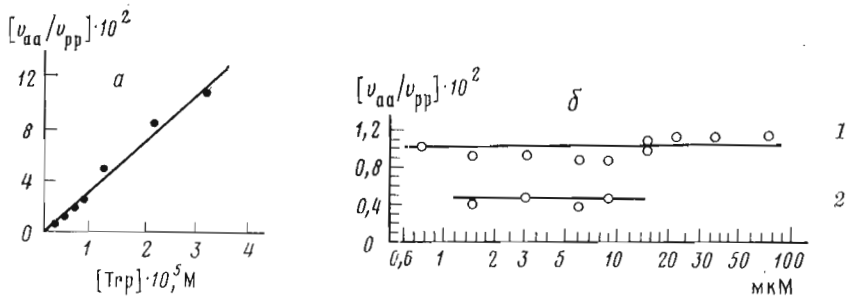


Рис. 2. Зависимость отношения скоростей аминокцилирования и пирофосфатного обмена от концентрации триптофана (а) и лейцина (б). Реакционные смеси содержали: а) Трп-тРНК – синтетазу 4,1 мкг/мл, АТР 0,75 мМ, РР₁ 0,8 мМ, тРНК^{Трп} 1,14 мкМ; б) Leu-тРНК – синтетазу 0,2 мкг/мл, АТР 2 мМ, тРНК^{Leu} 0,2 мкМ, РР₁ 0,14 (1) и 0,28 мМ (2). Реакцию проводили при 25° С в течение 10 мин

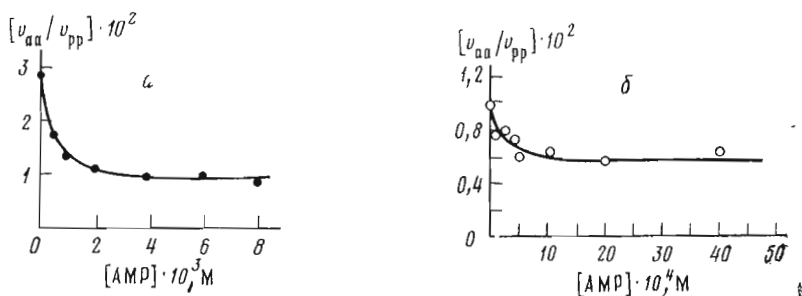


Рис. 3. Зависимость отношения скоростей аминокцилирования и пирофосфатного обмена от концентрации АМР. а) Трп-тРНК – синтетаза; реакционная смесь содержала: РР₁ 0,4 мМ, тРНК^{Трп} 1,08 мкМ, АТР 0,7 мМ, Трп 40 мкМ. б) Leu-тРНК – синтетаза; реакционная смесь содержала: Leu 10 мкМ, [³²Р]пирофосфат 0,17 мМ. Остальные условия см. рис. 2

Теоретические зависимости отношения скоростей от концентраций АТР и пирофосфата однотипны для одномаршрутных механизмов реакции аминокцилирования тРНК. Экспериментальная проверка показала, что в случае АТР, как и ожидалось, отсутствует зависимость отношения скоростей от ее концентрации. В случае же пирофосфата кривая v_{pp}/v_{aa} лишь в ранней фазе совпадает с ожидаемой линейной зависимостью и при дальнейшем увеличении концентрации пирофосфата отклоняется от нее. Полученная нелинейная зависимость может означать, что в последовательности стадий, приводящих к образованию аминокцил-тРНК, пирофосфат по меньшей мере дважды взаимодействует с ферментом.

Зависимость v_{aa}/v_{pp} от концентрации аминокцилослотов (рис. 2) резко различается для обоих синтетаз. В случае триптофанил-тРНК-синтетазы один из характеристических признаков – прямая пропорциональная зависимость измеренного отношения скорости от концентрации триптофана – согласуется с механизмами, в которых аминокислота взаимодействует с ферментом позже АТР.

Зависимость отношения скоростей от концентрации АМР аналогична для обеих аминокцил-тРНК-синтетаз (рис. 3). С увеличением концентрации АМР сначала происходит уменьшение отношения v_{aa}/v_{pp} , затем эта величина остается постоянной и характеризует маршрут, по которому освобождение аминокцил-тРНК происходит независимо от АМР; следовательно, АМР и аминокцил-тРНК освобождаются от фермента неупорядоченно.

Проведенное изучение двух аминокцил-тРНК-синтетаз показывает, что структура кинетической модели реакции образования аминокцил-

тРНК имеет по меньшей мере два уровня сложности. Первый характеризует число реакционных маршрутов и способ их соединения в общую сеть реакции. Второй относится к структуре отдельных маршрутов, состоящих из определенной последовательности элементарных стадий.

4. Анализ кинетики образования триптофанил-тРНК

Выше показано, что триптофанил- и лейцил-тРНК-синтетазы могут катализировать реакцию образования аминоксил-тРНК по двум различным маршрутам. Один из них начинается с присоединения к ферменту низкомолекулярных субстратов, второй — с присоединения тРНК. Однако не установлено, с чем взаимодействует тРНК: с комплексом фермент-аминоациладенилат или со свободным ферментом. Для решения этого вопроса мы провели дополнительное изучение кинетики реакции образования триптофанил-тРНК с использованием статистического метода анализа [30]. Экспериментальные зависимости скорости реакции от концентрации субстратов и ингибиторов были сопоставлены с кинетическими уравнениями, выведенными для разных гипотез о механизме реакции. Для улучшения дискриминации гипотез измерение скорости реакции проводили в присутствии двух типов ингибиторов — аналогов триптофана и АТР.

4.1. Механизмы реакции

Выбор механизмов реакции неизбежно ограничивается возможностями ЭВМ, поэтому мы проверили самые простые реакционные последовательности, а также те сложные гипотезы, которые всего вероятнее следуют из совокупности данных, полученных нами ранее либо имеющихся в литературе.

Хотя из анализа отношения скоростей вытекало, что механизм реакции является сложным, мы включили в рассмотрение одномаршрутные последовательности, предполагая, что они могут быть основными «пропускными каналами» реакции (схемы 1–6, табл. 3). В остальных механизмах табл. 3 одномаршрутные последовательности соединены в общую схему двумя способами. Схемы 7 и 8 представляют собой варианты механизма Яруса и Берга [31], а схемы 9 и 10 содержат параллельные маршруты, один из которых начинается с присоединения к свободному ферменту низкомолекулярных субстратов, а другой — с присоединения тРНК.

4.2. Определение вероятностей механизмов

В табл. 3 приведены значения критериев для сопоставления кинетических уравнений с экспериментальными данными. Механизмы 5 и 6 имеют худшие значения, и поэтому мы исключили их из дальнейшего рассмотрения. К остальным была применена процедура вычисления относительных вероятностей гипотез. Вероятности всех механизмов, кроме вариантов механизма Яруса и Берга, упали до нуля. Различия между оставшимися моделями невелики (0,13 и 0,87), поэтому выбор между ними сделать нельзя.

Хотя полная дискриминация не достигнута, симптоматично, что большую вероятность получили механизмы одного типа, имеющие реакционный цикл, в котором отсутствует свободная форма фермента. Механизм, лежащий в основе этих схем, был предложен Ярусом и Бергом, исходя из другого типа экспериментов для изолейцил- и лейцил-тРНК-синтетаз, принадлежащих к мономерным белкам [31–33]. Кинетическая модель, соответствующая этому механизму, приложима также и к некоторым механизмам действия субъединичных ферментов, имеющих два активных центра. Примером является предложенный Лаздунским механизм флип-флоп (триггер), в котором два эквивалентных в свободном ферменте

Возможные механизмы образования триптофан-тРНК

Номер схемы	Схема механизма	ε_i %	F_i	P
1	$E \xrightleftharpoons{R} ER \xrightleftharpoons{A} ERA \xrightleftharpoons{T} ERAT$	37,4	65,1	10^{-20}
2	$E \xrightleftharpoons{A} EA \xrightleftharpoons{R} EAR \xrightleftharpoons{T} EART$	32,1	45,4	10^{-20}
3	$E \xrightleftharpoons{T} ET \xrightleftharpoons{R} ETR \xrightleftharpoons{A} ETRA$	30,8	45,4	10^{-20}
4	$E \xrightleftharpoons{Y} ET \xrightleftharpoons{A} ETA \longrightarrow EP \xrightleftharpoons{R} EPR$	41,2	80,3	10^{-20}
5	$E \xrightleftharpoons{A} EA \xrightleftharpoons{T} EAT \longrightarrow EP \xrightleftharpoons{R} EPR$	68,5	146,2	—
6	$E \xrightleftharpoons{R} ER \xrightleftharpoons{T} ERT \xrightleftharpoons{A} ERTA$	47,3	93,2	—
7	$EA \xrightleftharpoons{T} EAT \longrightarrow EP \xrightleftharpoons{aaR} E(PR)AT$	26,5	40,5	0,13
8	$EA \xrightleftharpoons{T} EAT \longrightarrow EP \xrightleftharpoons{aaR} E(PR)TA$	27,5	42,4	0,87
9)	$EA \xrightleftharpoons{A} EAT \longrightarrow EP \xrightleftharpoons{aaR} E(PR)TA$	31,1	43,9	10^{-20}

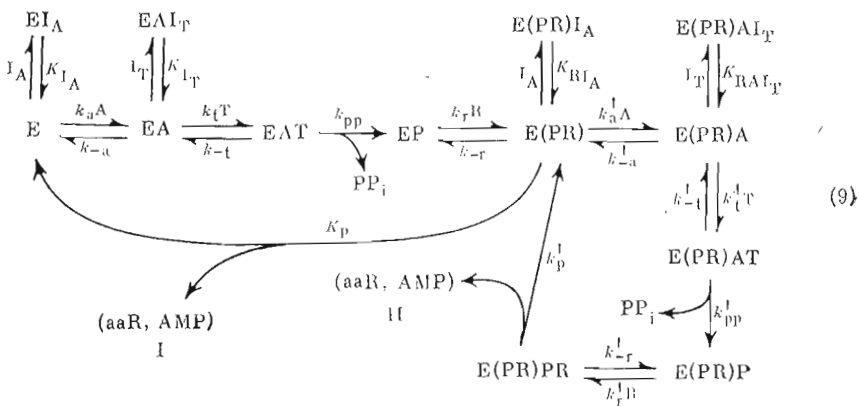
Номер схемы	Схема механизма	ϵ_i %	F_i	P
10		30,1	42,0	10^{-20}

Примечание. E — фермент, A — АТФ, T — триптофан, R — тРНК, P — аминокислотаденилат, aaR — аминокислот-тРНК. Чтобы не загромождать схемы, на них не указаны ферментные формы, содержащие ингибиторы.

активных центра приобретают различные состояния, а в реакционном цикле обмениваются ими [34].

Очевидно, что механизмы Яруса и Берга и триггерный механизм при всем формальном сходстве принципиально различны, так как их функционирование объясняется действием разных структурных элементов. Вторая модель более подходит для триптофанил-тРНК-синтетазы, так как состоит из двух идентичных субъединиц [35] и содержит по два центра сорбции для каждого из субстратов [36, 37], поэтому далее будем употреблять термин «триггерный механизм».

Дополнительно мы рассмотрели еще один вариант триггерного механизма, отличающийся от механизма 7 (табл. 3) тем, что в нем имеется стадия присоединения тРНК к ферментной форме, содержащей молекулу аминокислот-тРНК. Расчет вероятности этой модели относительно механизма 8 показал, что она более адекватна экспериментальным данным. После обсчета всей серии экспериментальных точек ее вероятность оказалась близкой к единице, в то время как вероятность механизма 8 упала до $0,37 \cdot 10^{-2}$. Мы сопоставили относительные эффективности двух маршрутов образования триптофанил-тРНК. Оказалось, что в цикле II образование продукта идет в десятки раз быстрее, чем в цикле I при концентрациях субстратов, близких к их K_m . Ниже приведена схема реакции, получившая наибольшую вероятность, и уравнение скорости образования триптофанил-тРНК.



I_A — α , β -метиленовый аналог АТФ, I_T — триптамин, K — константы диссоциации комплексов.

Доля маршрута I реакции

$$\alpha_1 = k_p / \left(k_p + k'_a A / \left(1 + \frac{k_{-a}}{k'_T T} \left(1 + \frac{k_{-t}}{k_{pp'}} \right) \right) \right) \quad (10)$$

Доля маршрута II реакции

$$\alpha_2 = 1 - \alpha_1, \quad (11)$$

$$\begin{aligned} \frac{e}{v} = & \alpha_2 \left(\frac{1}{k_p'} + \frac{1}{k_r'R} \left(1 + \frac{k_{-r}'}{k_p'} \right) + \frac{1}{k_{rp}'} + \frac{1}{k_t'T} \left(1 + \frac{k_{-t}'}{k_{pp}'} \right) \left(1 + \frac{I_T}{K_{RAI_T}} \right) \right) + \\ & + \alpha_1 \left(\frac{1}{k_p} \left(1 + \frac{I_A}{K_{RAI_A}} \right) + \frac{1}{k_rR} \left(1 + \frac{k_{-r}}{k_p} \right) + \frac{1}{k_{pp}} + \right. \\ & \left. + \frac{1}{k_tT} \left(1 + \frac{k_{-t}}{k_{pp}} \right) \left(1 + \frac{I_T}{K_{AI_T}} \right) + \frac{1}{k_aA} \left(1 + \frac{k_{-a}}{k_tT} \left(1 + \frac{k_{-t}}{k_{pp}} \right) \right) \left(1 + \frac{I_A}{K_{IA}} \right) \right). \quad (12) \end{aligned}$$

5. Проявление положительной и отрицательной кооперативности активных центров аминоксил-тРНК — синтетаз при взаимодействии с тРНК

Установление функциональной димерности большинства изученных аминоксил-тРНК-синтетаз [1-3, 6-9] делает существенными вопросы, связанные с характером взаимодействия их активных центров. Особенно интересны в этом отношении стадии реакции, на которых к ферменту присоединяются молекулы тРНК, поскольку образование «правильной» аминоксил-тРНК более специфично, чем предыдущие стадии реакции [1-3].

Мы исследовали [38] влияние тРНК на кинетику PP_i -АТР-обмена и образования аминоксил-тРНК, катализируемых аминоксил-тРНК-синтетазами трех основных типов четвертичной структуры: лейцил-тРНК-синтетаза (α); фенилаланил-тРНК-синтетаза ($\alpha_2\beta_2$); триптофанил-тРНК-синтетаза (α_2). Как видно из рис. 4, при достаточно высоких концентрациях тРНК нет ни в одном случае полного ингибирования PP_i -АТР-обмена. Остаточная активность составляет около половины от исходной величины.

Статистическая обработка экспериментальных данных показала, что характер изменения активности лейцил- и фенилаланил-тРНК-синтетаз в PP_i -АТР-обмене при добавлении соответствующих тРНК практически не зависит от комбинации остальных субстратов [38]. Это означает, что присоединение тРНК приводит к образованию различных фермент-субстратных комплексов, участвующих в реакции, в соотношении, независимом от концентрации остальных субстратов. Независимость степени ингибирования обмена от концентраций остальных субстратов указывает на полное ингибирование лишь части активных центров, тогда как оставшиеся продолжают катализировать реакцию. Сходные эксперименты, выполненные позже на метионил-тРНК-синтетазе из *E. coli* [39], подтверждают это заключение.

При оценке влияния тРНК на скорость PP_i -АТР-обмена во всех случаях получен коэффициент Хилла, равный примерно 0,5, что, как принято считать [40], означает сильную кооперативность между центрами сорбции тРНК на исследуемых синтетазах. В то же время применение анализа по Хиллу к экспериментальным зависимостям скоростей образования лейцил- и триптофанил-тРНК от концентрации соответствующей тРНК приводит к величине коэффициента Хилла, примерно равной 2 (рис. 5).

Из полученных данных наиболее существенно то, что в первой реакции обнаруживается отрицательная кооперативность, в то время как в реакции аминокислирования тРНК кооперативность положительна. Такое совмещение взаимодействий противоположного знака можно объяснить триггерной моделью работы аминоксил-тРНК-синтетаз, которую мы обсуждали в предыдущем разделе. Согласно этой модели, молекулам тРНК принадлежит важная роль в упорядочении участия обоих активных центров в катализе.

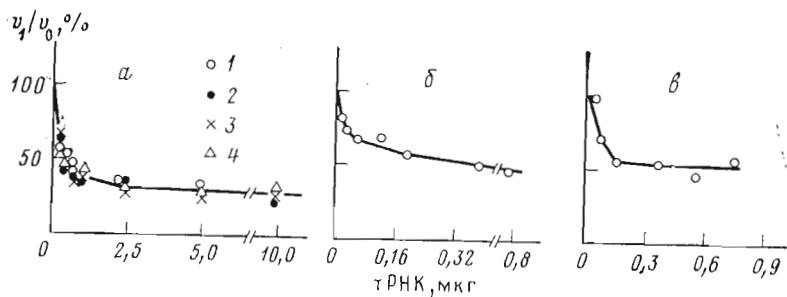


Рис. 4. Ингибирование $[^{32}\text{P}]\text{ATP}-\text{PP}_1$ -обмена в присутствии тРНК, а) Phe-тРНК – синтетаза 1,2 мкг/мл, АТФ 0,2 (1, 2) или 0,5 мМ (3, 4), Phe 0,02 (1, 3, 4) или 0,12 мМ (2), PP_1 0,04 (1, 3) или 0,12 мМ (2, 4). Реакцию проводили при 25° С в течение 5 мин. б) Leu-тРНК – синтетаза 0,2 мкг/мл, АТФ 2 мМ, Leu 7,5 мкМ, PP_1 0,1 мМ, остальные условия как в а. в) Trp-тРНК – синтетаза 4,1 мкг/мл, АТФ 0,75 мМ, Trp 2,9 мкМ, PP_1 1 мМ, остальные условия как в а

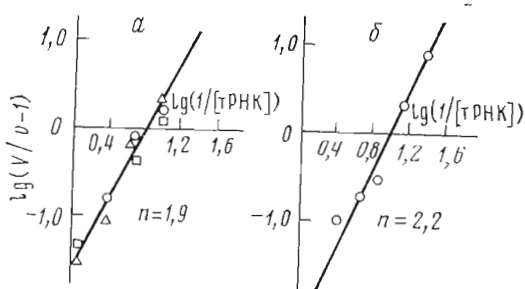


Рис. 5. Графики Хилла для образования аминоксил-тРНК как функции концентраций тРНК^{Leu} (а), тРНК^{Trp} (б). Условия реакций те же, что указаны в рис. 4б и в соответственно

Сходство результатов, полученных на синтетазах, принадлежащих к трем типам ($\alpha_2\beta_2$, α_2 и α), говорит в пользу существования для них общего механизма действия. С этим согласуются как имеющиеся данные по псевдо- или истинносубъединичной структуре большинства аминоксил-тРНК-синтетаз [6, 41–46], так и обнаруженная антикооперативность в связывании молекул тРНК различными синтетазами [47, 48–53].

6. Кинетические свойства химически модифицированных (одноцентровых) препаратов триптофанил-тРНК-синтетазы

Поскольку механизм действия синтетаз зависит от взаимодействия их активных центров, представляет интерес исследование реакций, катализируемых аминоксил-тРНК-синтетазой, имеющей один активный центр, и сравнение ее свойств со свойствами нативного фермента. Такие препараты ферментов можно получить при химической модификации одного из активных центров с помощью специфических реагентов. В экспериментах, описанных ниже, были использованы аффинные модификации триптофанил-тРНК-синтетазы с помощью N-хлорамбуцилтриптофанил-тРНК (Сб-Трп-тРНК) и триптофанилметилхлорида (Трп-СН₂-Cl). Первый реагент является аналогом аминоксил-тРНК и специфически модифицирует один из двух центров триптофанил-тРНК-синтетазы [47, 54, 55]. Модификация этой синтетазы триптофанилметилхлоридом – аналогом триптофана – также приводит к получению одноцентровой формы фермента [56].

При модификации можно ожидать как изменения механизма катализируемых реакций, так и существенного изменения кинетических параметров стадий. Эти различия должны иметь место и при сравнении модифицированных форм фермента. Рассмотрим результаты, полученные при

Константы диссоциации фермент-субстратных комплексов для нативного фермента и модифицированных препаратов триптофанил-тРНК — синтетазы

Номер стадий	Тип стадий	Реакция	K дис, мкМ		
			нативный фермент	Св-Трп-тРНК-Е	Трп-СН ₂ -Е
1	Продуктивная	$ES_1 \rightleftharpoons E + S_1$	630±320	340±20	1170±200
2	»	$ES_1S_2 \rightleftharpoons ES_1 + S_2$	0,18±0,08	0,28±0,07	0,43±0,17
3	»	$ES_1S_2 \rightleftharpoons EP + PP_1$	14±8	55±0,4	56±10
4	Непродуктивная	$ES_2 \rightleftharpoons E + S_2$	0,12±0,05	1,3±0,1	62±20
5	»	$EI \rightleftharpoons E + I$	2,1±1,5	500±470	14±2
6	»	$ES_1I \rightleftharpoons ES_1 + I$	0,32±0,06	1,3±0,04	0,3±0,04
7	»	$EPP_1 \rightleftharpoons E + PP_1$	160±50	770	1150±130
	Общая реакция	$E + S_1 + S_2 \rightleftharpoons EP + PP_1$ $K_{равн} (мкМ^{-1})$	0,12	0,58	0,11

Примечание. E — фермент, S₁ — АТФ, S₂ — триптофан, PP₁ — пиррофосфат, P — аминокциладенилат, I — триптамин.

изучении двух форм триптофанил-тРНК-синтетазы, модифицированных с помощью N-хлорамбуцилилтриптофанил-тРНК (Св-Трп-тРНК-Е) и триптофанилметилхлорида (Трп-СН₂-Е) [57, 58].

Эти ферментные препараты были использованы для определения скоростей PP₁ — АТФ-обмена и последующей кинетической обработки результатов. Как и ранее с нативным ферментом, мы рассмотрели три основных кинетических механизма реакции (см. схему 4). Оказалось, что как для Св-Трп-тРНК-Е, так и для Трп-СН₂-Е наибольшую вероятность, близкую к 1, имеет механизм I. Таким образом, модификация триптофанил-тРНК — синтетазы как аналогом аминокцил-тРНК, так и аналогом аминокислоты не приводит к изменению механизма реакции, порядок субстратов остался прежним: первый субстрат — АТФ, второй — триптофан.

В табл. 4 приведены стадии реакции АТФ — PP₁-обмена и константы диссоциации для нативного и модифицированных ферментов. Стадии реакции разбиты на две группы: продуктивные стадии 1, 2 и 3 соответствуют маршруту образования аминокциладенилата, остальные — образованию нереакционноспособных промежуточных соединений. Из сравнения констант равновесия реакций для Св-Трп-тРНК-Е и нативного фермента следует, что модификация синтетазы заметно сдвигает равновесие в сторону образования комплекса фермент — аминокциладенилат. Ослабляется образование тупиковых комплексов, причем ослабление взаимодействия синтетазы с триптофаном находится в контрасте с сохранением низкой K_{дис} для реакции $ES_1 + S_2 \rightleftharpoons ES_1S_2$. Таким образом, при модификации фермента параметры продуктивных стадий реакции несколько «улучшаются», в то время как образование непродуктивных комплексов существенно ослабляется.

Присутствие на модифицированных ферментах молекулы АТФ приводит к значительному улучшению параметров связывания как триптофана (стадия 2), так и триптамина (стадия 6). Этот результат согласуется с синергическим эффектом АТФ на связывание аминокислот с различными аминокцил-тРНК — синтетазами [45, 59—62], хотя нигде не обсуждалось ранее, относятся эти эффекты к взаимодействию активных центров или они локализованы в одном активном центре. По-видимому, главным здесь является отрицательное кооперативное взаимодействие между центрами, связывающими аминокислоту, которое снимается в присутствии молекулы АТФ.

Из сравнения приведенных данных можно предположить, что аминокислотная часть аналога аминокцил-тРНК обеспечивает синергический эффект на связывание триптофана по второму центру в присутствии АТФ и ослабляет связывание пиррофосфата, в то время как участок молекулы тРНК обеспечивает триггерный характер работы обоих центров, улучшение дискриминационных свойств фермента и эффективность реакции.

7. Механизм функционирования триптофанил-тРНК — синтетазы [63]

По результатам исследования триптофанил-тРНК-синтетазы можно построить общую схему, отражающую механизм функционирования этого фермента. Задача по существу сводится к совмещению данных по связыванию субстратов, а также полученных кооперативных эффектов с кинетическими результатами, полученными при исследовании нативного и модифицированных препаратов фермента. Лучше всего совокупность обнаруженных свойств фермента согласуется с триггерным механизмом функционирования триптофанил-тРНК-синтетазы. Предлагаемый механизм схематически изображен на рис. 6.

При вступлении свободного фермента в реакцию происходит последовательное присоединение АТР и триптофана с образованием триптофанил-аденилата и отщеплением пирофосфата (стадии 1—3). Присоединение тРНК должно состоять из целого ряда этапов, из которых первым является сорбция (стадия 4а) [64, 65]. На следующих этапах должна происходить «подгонка», т. е. взаимное распознавание и более прочное взаимодействие между структурами тРНК и фермента в случае, если их аминокислотная специфичность совпадает (стадия 4б) [65, 66]. После стадии подгонки аминокислотный остаток переносится на тРНК. Тройной комплекс Аас-тРНК·Е·АМР способен к произвольной диссоциации образовавшихся продуктов от фермента. Однако ввиду более быстрого освобождения от фермента низкомолекулярных лигандов [67, 68] на схеме стадии 5 обозначает отщепление АМР. После стадии 5 может произойти переход Е·Аас-тРНК^{*} в форму продуктивного комплекса фермент — продукт Е·Аас-тРНК, как показано Холлером [69]. Если реализуется эта стадия 12а, то после удаления Аас-тРНК свободный фермент заново вовлекается в последовательность стадий 1—3, т. е. каталитический цикл замыкается. В присутствии достаточных концентраций низкомолекулярных субстратов роль цикла III второстепенна. К комплексу фермента с аминоацил-тРНК присоединяется АТР и триптофан с образованием после стадии 8 (рис. 6) тройного комплекса Е·аминоациладенилат·Аас-тРНК.

Превращение этого тройного комплекса возможно по двум путям. При низких концентрациях тРНК происходит двухступенчатая диссоциация аминоацил-тРНК (стадии 9а и б), а комплекс аденилата с ферментом вступает во взаимодействие с новой молекулой тРНК (цикл I). При высоких концентрациях тРНК, достаточных для связывания по второму центру (стадия 10а), функционирует цикл II. Имеющиеся на ферменте после стадии 10а молекулы тРНК неэквивалентны, так как тРНК, только что сорбированная на втором центре, еще не успела пройти стадию подгонки [69, 69а, 70]. Любая из двух молекул тРНК может отщепиться легче за счет отрицательного кооперативного взаимодействия [48, 64]. Отщепление тРНК возвращает нас на стадию назад, а в случае, если фермент покидает триптофанил-тРНК (стадия II), образующаяся при этом форма Е·(АМР~тРп)·тРНК^{*} замыкает цикл III.

Функционирование циклов I и II наглядно объясняет сочетание положительной кооперативности в реакции аминоацилирования с отрицательной кооперативностью при связывании тРНК.

Описываемый механизм функционирования триптофанил-тРНК — синтетазы может отражать общие свойства аминоацил-тРНК — синтетаз, даже если их частные характеристики различны.

Кинетический механизм многоцентровых ферментов имеет по меньшей мере два уровня организации: 1) порядок функционирования каждого центра; 2) способ организации отдельных центров в единую каталитическую систему. Для аминоацил-тРНК — синтетаз не найдено универсальной последовательности присоединения субстратов. Примерно в половине исследованных случаев АТР является первым субстратом, на втором месте — механизм произвольного присоединения субстратов [1, 2]. Лабуэсс и др. [71] подтвердили найденный нами порядок присоединения низкомолекулярных субстратов к триптофанил-тРНК — синтетазе из поджелудочной

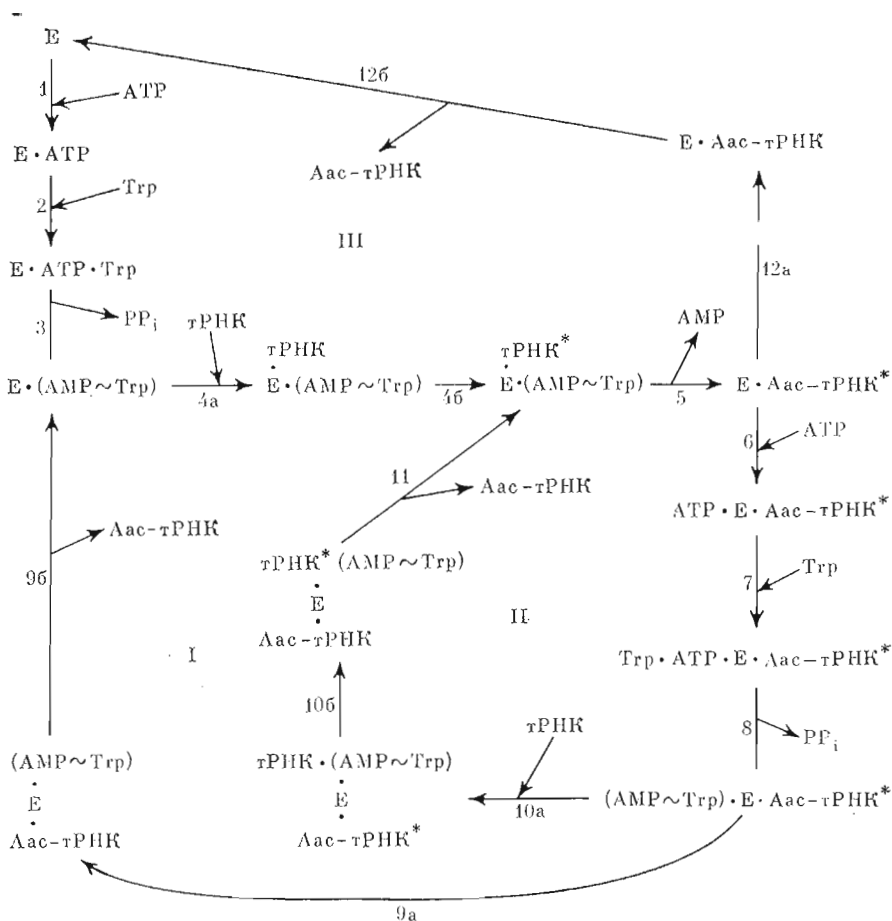


Рис. 6. Схема функционирования триптофанил-тРНК – синтетазы

железы быка. Кроме того, они показали, что изменение условий реакции (понижение концентрации ионов Mg^{2+}) вызывает переход на произвольный порядок присоединения АТФ и триптофана к ферменту. Следовательно, не исключено и обратное, а именно упорядочение присоединения субстратов в некоторых условиях для тех аминоксил-тРНК – синтетаз, для которых показан произвольный порядок присоединения. Из всех субстратов этой реакции АТФ представляется наиболее подходящим для первичного связывания, поскольку это универсальный субстрат, содержащий макроэргические связи, энергия которых может быть использована на значительные преобразования структуры промежуточного комплекса [72, 73].

Вторым существенным вопросом, относящимся к функционированию одного активного центра, является участие аминоксиладенилата в качестве промежуточного соединения при ацилировании тРНК [1–3]. Несмотря на появившиеся в литературе сомнения относительно участия аминоксиладенилата в продуктивном маршруте образования некоторых аминоксил-тРНК [74–77], большинство заново поставленных экспериментов свидетельствует в пользу классической схемы реакции с участием адеплатов [26–29].

Таким образом, на уровне функционирования одного активного центра механизм, включающий присоединение к ферменту субстратов в порядке АТФ, аминокислота и тРНК и участие в реакции комплекса с аминоксиладенилатом, приложим ко многим синтетазам: лейцил-тРНК – синтетазе из дрожжей, лейцил-, валил-, серил- и пролил-тРНК – синтетазам из *E. coli*, треонил-тРНК – синтетазе из печени крысы, триптофанил-тРНК – синтетазе из *E. coli*, плаценты человека и поджелудочной железы быка [3, 12, 23, 78].

Общие свойства синтетаз обнаруживаются и на более высоком уровне организации их каталитического механизма, обусловленном межцентровыми взаимодействиями [78а]. В этой связи особый интерес представляет отрицательная кооперативность в связывании тРНК, которая доказана для ряда аминоксил-тРНК — синтетаз различными методами [48, 61, 64, 65, 79—81] и является одним из факторов, определяющих триггерный характер механизма образования аминоксил-тРНК. Варианты триггерного механизма предложены для фенилаланил-тРНК — синтетазы из дрожжей ([60, 82, см. также [83]), серил-тРНК — синтетазы из *Saccharomyces carlsbergensis* [84], аргинил-тРНК — синтетазы из *B. stearothermophilus* [85]. Можно думать, что дальнейшие исследования кинетики аминокислирования тРНК приведут к увеличению числа «триггер»-аминоксил-тРНК — синтетаз.

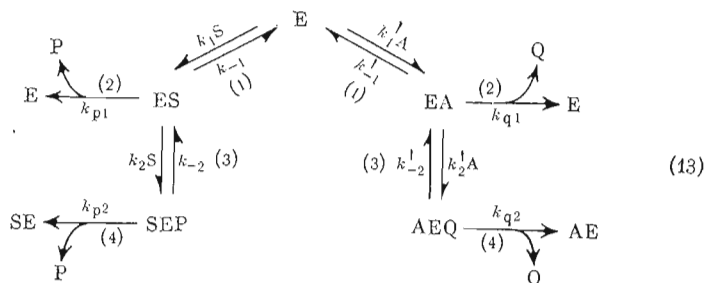
Синтетазы, имеющие мономерную структуру, на первый взгляд не могут быть отнесены к ферментам, функционирующим по триггерному механизму. Однако существуют экспериментальные свидетельства в пользу того, что мономерные аминоксил-тРНК — синтетазы могут иметь псевдосубъединицы, ковалентно связанные между собой, и каждая из них может иметь отдельный каталитический центр [6, 41—45].

Имеется и другой возможный путь организации двухцентрового фермента. Для ряда мономерных синтетаз обнаружена димеризация молекул фермента при взаимодействии с тРНК [86—88]. Характерно, что для ферментов, специфичных к аргинину, глутамину и глутаминовой кислоте, зависимость от аминокислоты [³²P]пирофосфат — АТР-обмен возможен только в присутствии тРНК [89]. Если действительно в присутствии тРНК идет образование каталитически активного ассоциата исходных молекул синтетаз, то очевидна ее важная роль в образовании многоцентровой ферментной структуры, способной к проявлению полицентровой реакционной способности. Можно полагать, что такой ассоциат осуществляет каталитические циклы по триггерному механизму, описанному выше, а его димерное состояние поддерживается за счет постоянного присутствия молекулы тРНК или аминоксил-тРНК на одном из центров.

Таким образом, для триггерного механизма не столь существенны наблюдаемые различия в исходной структуре свободных аминоксил-тРНК — синтетаз, хотя, разумеется, необходима прямая экспериментальная проверка его применимости в каждом случае. В частности, триггерный механизм пока не приложим к цистеинил-тРНК — синтетазе из *B. stearothermophilus* [90] и глутамил-тРНК — синтетазе из *E. coli* [91], для которых показан структурный и постулирован функциональный мономеризм.

8. Роль триггерного механизма в усилении специфичности аминоксил-тРНК — синтетаз

Имеет ли преимущество триггерный механизм, в котором происходит двукратное присоединение субстрата одного типа к ферменту, в способности дискриминировать правильный и ошибочный субстрат? Сравним схему Михаэлиса и триггерную схему для случая образования альтернативных продуктов P и Q в наиболее простом варианте.



Здесь S и A — альтернативные субстраты, реакционная последовательность 1—2 соответствует образованию продуктов по схеме Михаэлиса, а последовательность 1—3—4 соответствует триггерному механизму [34].

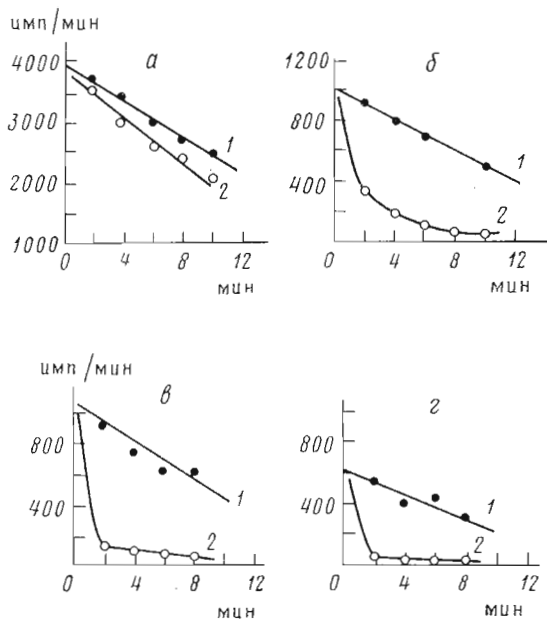


Рис. 7. Определение устойчивости комплексов триптофанил-тРНК — синтетазы с аминокацилденилатами с помощью фильтрования через нитроцеллюлозные фильтры: а) триптофанилденилат, б) 5-фтортриптофанилденилат, в) 6-фтортриптофанилденилат, г) 7-фтортриптофанилденилат; 1 — в отсутствие свободного триптофана, 2 — в присутствии 0,5 мМ триптофана

Наиболее очевидный результат можно получить, предположив быстро устанавливающееся равновесие между свободным ферментом и фермент-субстратными комплексами. В схеме Михаэлиса отношение скоростей образования истинного продукта и его аналога равно

$$\frac{v_s}{v_a} = \frac{k_{p1}}{k_{q1}} \cdot \frac{k_1 S}{k_{-1}} \cdot \frac{k'_{-1}}{k'_1 A} = \frac{k_{p1}}{k_{q1}} \cdot \frac{S}{A} \cdot \frac{K_{D1}^A}{K_{D1}^S}, \quad (14)$$

в случае триггерного механизма

$$\frac{v_s}{v_a} = \frac{k_{p1}}{k_{q1}} \cdot \frac{S^2}{A^2} \cdot \frac{K_{D1}^A \cdot K_{D2}^A}{K_{D1}^S \cdot K_{D2}^S}.$$

Видно, что усиление дискриминации в триггерном механизме может обеспечиваться, если наряду с $K_{D1}^A > K_{D1}^S$ имеет место $K_{D2}^A > K_{D2}^S$. Это усиление

может быть весьма значительным, если различия между K_D^S и K_D^A достигают нескольких порядков, что и найдено, в частности, для взаимодействия фенилаланил-тРНК — синтетазы из дрожжей с тРНК^{Ala} и тРНК^{Phe} [92]. Таким образом, триггерный механизм может быть включен в разряд механизмов, допускающих усиление специфичности фермента при выборе правильного субстрата [93].

В рассматриваемой схеме триггерного механизма нет гибридных комплексов типа AES, образование и превращение которых, согласно Фершту [45], устраняет возможность повышения специфичности фермента, имеющего два центра. Ферштом, однако, не учтены экспериментально обнаруженные особенности взаимодействия синтетаз с субстратами и их аналогами.

Мы исследовали влияние добавок свободной аминокислоты на устойчивость предварительно выделенных комплексов триптофанил-тРНК — синтетазы из поджелудочной железы с различными аминокацилденилатами [94]. Добавление триптофана (рис. 7) лишь немного ускоряет

диссоциацию «правильного» комплекса, в то время как комплексы фермента с 5-, 6- и 7-фторзамещенными аналогами триптофаниладенилата разрушаются весьма быстро. Действие триптофана строго специфично. Добавление других аминокислот не влияет на скорость диссоциации комплексов. Следовательно, гибридные комплексы нестабильны и разрушаются с освобождением «ошибочного» аминоациладенилата. Нестабильность гибридных комплексов, по-видимому, общее свойство синтетаз, как это вытекает из целого ряда данных по конкурентному взаимодействию с ними альтернативных субстратов, включая и тРНК [52, 68, 95, 96].

Дискриминирующая роль межцентровых взаимодействий является новым моментом в рассмотрении механизмов повышения специфичности аминоацил-тРНК — синтетаз. В ранее предложенных механизмах не учитывалось, что эти ферменты в большинстве случаев являются функциональными димерами [84, 87, 88]. Гидролитические механизмы коррекции [97—100] и триггерный механизм не являются взаимоисключающими. Они могут быть увязаны в единый процесс контроля, действие которого осуществляется на целом ряде стадий превращения фермент-субстратных комплексов и обеспечивает более низкий расход АТФ, чем предсказывается для гидролитического контроля реакции [101—103].

Не исключено, что описываемые преимущества триггерного механизма обеспечили его возникновение в ходе эволюции для одной из ключевых реакций биосинтеза белка — образования аминоацил-тРНК.

Заключение

Со времени Христиансена [104], который был уверен в возможности однозначного выбора правильного механизма реакции с помощью кинетического анализа, эти взгляды претерпели значительную эволюцию, и в научной практике утвердилось положение, согласно которому кинетическим методам отводится более скромная роль. С их помощью можно отвергнуть неподходящие гипотезы о механизме и выбрать лучшую из рассматриваемых, хотя для доказательства ее правильности необходимы дополнительные исследования.

Общие представления об аминоацил-тРНК — синтетазах, складывающиеся из результатов многочисленных исследований, кажутся сейчас достаточно размытыми. В то же время существование семейства молекул тРНК, для которых, несмотря на огромную вариабельность первичной структуры, объединяющими оказались «клеверный лист» и *L*-форма пространственной структуры [105], служит обнадеживающим примером, поскольку тРНК — важнейший субстрат для аминоацил-тРНК — синтетаз.

Возможно, что в случае синтетаз также необходимы поиски общих закономерностей в структуре и механизме их действия на более высоком уровне организации каталитической системы, в котором межцентровые взаимодействия могут играть важную роль, определяя последовательность конформационных перестроек, обеспечивающую взаимную адаптацию структур фермента и субстратов и тем самым образование кинетически компетентных комплексов [106—111].

Возможности кинетических подходов к исследованию аминоацил-тРНК — синтетаз заметно расширились. В частности, интересны перспективы аффинной модификации синтетаз, которая позволит не только изучить функциональные группы активных центров, но и дать также целый спектр специфически модифицированных молекул ферментов, сохранивших часть каталитической активности [54]. Исследование их свойств должно привести к углублению понимания природы взаимодействия активных центров. Привлекает внимание идея, согласно которой сама кинетика аффинного мечения фермента может дать важную информацию о взаимодействии истинных субстратов с активным центром [112—113].

С развитием методов быстрой кинетики не утратило своего значения исследование стационарных ферментативных реакций. Оба подхода направлены на решение разных задач и являются взаимодополняющими. Измерения в секундном диапазоне позволяют оценить параметры отдель-

ных стадий, в то время как интегральные характеристики реакции и ее маршрутов устанавливают, изучая стационарный режим реакции.

Новым экспериментальным фактом, поставившим трудный вопрос перед ферментативной кинетикой, является возможное участие в катализе стадий, связанных с диссоциацией и ассоциацией субъединиц аминоктил-тРНК — синтетаз [85—87]. Рассмотрение модельных и экспериментальных примеров кинетического поведения диссоциирующих систем [114] показывает, что даже в случае односубстратных реакций ситуации могут быть достаточно сложными.

Новые факты иногда помогают ответить на старые вопросы, но чаще ставят новые. В частности, недавно показано эффективное воздействие на каталитическую активность бычьей триптофанил-тРНК — синтетазы [115] и фенилаланил-тРНК — синтетазы из *E. coli* [116] ряда нуклеотидов, а в некоторых препаратах бычьей триптофанил-тРНК — синтетазы обнаружен ковалентно связанный остаток триптофана, который, возможно, участвует в каталитическом процессе [117—119]. Пока не установлено, имеют ли эти факты прямое отношение к механизму действия данных ферментов. Заметим, что способность синтетаз гидролизовать аминоктил-тРНК, довольно долго фигурировавшая как курьез [120], в конечном счете оказалась сердцевиной изящного механизма исправления ошибок в образовании аминоктил-тРНК [100].

ЛИТЕРАТУРА

1. Kisselev L. L., Favorova O. O. Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol., 1974, v. 40, p. 141—238.
2. Söll D., Schimmel P. R. In: The Enzymes/Ed. Boyer P. D. N. Y.: Acad. Press, 1974, v. 10, p. 489—538.
3. Igloi G. L., Cramer F. In: Transfer RNA. Cambridge, Massachusetts and London: MIT Press, 1978, p. 249—349.
4. Schimmel P., Söll D. In: Ann. Rev. Biochem., 1979, v. 48, p. 601—648.
5. Cleland W. W. Biochim. et biophys. acta, 1963, v. 67, № 1, p. 104—137, 188—196.
6. Hartley B. In: Transfer RNA: structure, properties and recognition/Eds Schimmel P. R., Söll D., Abelson J. Cold Spring Harbor Laboratory, 1979, p. 223—234.
7. Blanquet S., Dessen Ph., Fayat G. In: Transfer RNA: structure, properties and recognition/Eds Schimmel P. R., Söll D., Abelson J. Cold Spring Harbor Laboratory, 1979, p. 281—293.
8. Cramer F., von der Haar F., Igloi G. L. In: Transfer RNA: structure, properties and recognition/Eds Schimmel P. R., Söll D., Abelson J. Cold Spring Harbor Laboratory, 1979, p. 267—288.
9. Феррир Э. Структура и механизм действия ферментов. М.: Мир, 1980.
10. Федоров В. В. В кн.: Новые идеи в планировании эксперимента/Ред. Налимов В. В. М.: Наука, 1969, с. 209.
11. Зиповьев В. В., Слинко М. Г., Тимошенко В. П., Малыгин Э. Г., Коржов В. А., Подгорный В. Ф. Молекулярн. биология, 1973, т. 7, № 1, с. 3—11.
12. Knorre D. G., Malygin E. G., Slinko M. G., Timoshenko V. I., Zinoviev V. V., Kisselev L. L., Kochkina L. L., Favorova O. O. Biochimie, 1974, v. 56, № 6—7, p. 845—855.
13. Volkenstein M. V., Goldstein B. N. Biochim. et biophys. acta, 1966, v. 115, № 3, p. 471—477.
14. Кнорре Д. Г., Малыгин Э. Г. Докл. АН СССР, 1972, т. 207, № 6, с. 1391—1393.
15. Vox G. E., Hill W. T. Technometrics, 1967, v. 9, № 1, p. 57—71.
16. Зиповьев В. В., Киселев Л. Л., Кнорре Д. Г., Кочкина Л. Л., Малыгин Э. Г., Слинко М. Г., Тимошенко В. П., Фаворова О. О. Молекулярн. биология, 1974, т. 8, № 3, с. 380—388.
17. Wang J. T. F., Hanes Ch. S. Can. J. Biochem. and Physiol., 1962, v. 40, № 6, p. 763—803.
18. Favorova O. O., Kochkina L. L., Meldrais J. A., Kisselev L. L., Zinoviev V. V., Knorre D. G., Lavric O. I., Malygin E. G., Nevinsky G. A. FEBS Lett., 1975, v. 56, № 2, p. 322—326.
19. Kisselev L. L., Fasiolo F., Malygin E. G., Zinoviev V. V. FEBS Lett., 1975, v. 59, № 2, p. 254—257.
20. Santi D. V., Danenberg P. V., Satterly P. Biochemistry, 1971, v. 10, № 25, p. 4804—4812.
21. Mulivor R., Rappoport H. P. J. Mol. Biol., 1973, v. 76, № 1, p. 123—134.
22. Tscherne J. S., Lanks K. W., Salim P. D., Grunberger D., Cantor C. H. R., Weinstein I. B. J. Biol. Chem., 1973, v. 248, № 11, p. 4052—4059.
23. Penneys N. S., Muench K. H. Biochemistry, 1974, v. 13, № 3, p. 566—571.
24. Малыгин Э. Г., Шапиль Ф., Мелер А. Молекулярн. биология, 1975, т. 9, № 1, с. 28—35.
25. Кочкина Л. Л., Ахвердян В. З., Малыгин Э. Г. Молекулярн. биология, 1976, т. 10, № 5, с. 1127—1132.

26. *Fersht A., Kaethner M. M.* Biochemistry, 1976, v. 15, № 4, p. 818-823.
27. *Lagerkvist V., Akesson B. J.* Biol. Chem., 1977, v. 252, № 3, p. 1002-1006.
28. *Midelfort C. F., Chakraborty K., Steinschneider A., Mehler A. H. J.* Biol. Chem., 1975, v. 250, № 10, p. 3866-3873.
29. *Fasiolo F., Ferscht A. R.* Eur. J. Biochem., 1978, v. 85, № 1, p. 85-88.
30. *Кочкина Л. Л., Ахвердян В. З., Киселев Л. Л., Зинovieв В. В., Малыгин Э. Г.* Молекулярн. биология, 1976, т. 10, № 2, с. 437-444.
31. *Yarus M., Berg P. J.* Mol. Biol., 1969, v. 42, № 2, p. 171-189.
32. *Rouget P., Chapeville F.* Eur. J. Biochem., 1971, v. 23, № 3, p. 443-451.
33. *Rouget P., Chapeville F.* Eur. J. Biochem., 1971, v. 23, № 3, p. 459-467.
34. *Lazdunsky M.* Curr. Top. Cell Regul., 1972, v. 6, p. 267-310.
35. *Kisselev L. L., Favorova O. O., Kovaleva G. K.* Methods in Enzymology, Part G, New York e. a., 1979, v. 59, p. 234-257.
36. *Dorizzi M., Labouesse B., Labouesse J.* Eur. J. Biochem., 1971, v. 19, № 4, p. 563-572.
37. *Graves P.-V., Bony J., Mazat J.-P., Labouesse B.* Biochimie, 1980, v. 62, № 1, p. 33-41.
38. *Malygin E. G., Zinoviev V. V., Fasiolo F., Kisselev L. L., Kochkina L. L., Achverdyan V. Z.* Mol. Biol. Reports, 1976, v. 2, № 6, p. 445-454.
39. *Jacques Y., Blanquet S.* Eur. J. Biochem., 1977, v. 79, № 2, p. 433-441.
40. *Koshland D. E., Jr., Nemethy G., Filmer D.* Biochemistry, 1966, v. 5, № 1, p. 365-385.
41. *Koch G. L. E., Boulanger Y., Hartley B. S.* Nature, 1974, v. 249, p. 316-320.
42. *Kula M. R.* FEBS Lett., 1973, v. 35, № 2, p. 299-301.
43. *Waterson R. M., Königsberg W. H.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1974, v. 71, № 2, p. 376-380.
44. *Bruton C. J.* Biochem. J., 1975, v. 147, № 1, p. 191-192.
45. *Fersht A. R.* Biochemistry, 1975, v. 14, № 1, p. 5-12.
46. *Mulvey R. S., Fersht A. R.* Biochemistry, 1977, v. 16, № 18, p. 4005-4013.
47. *Akhverdyan V. Z., Kisselev L. L., Knorre D. G., Lavrik O. I., Nevinsky G. A. J.* Mol. Biol., 1977, v. 113, № 3, p. 475-501.
48. *Blanquet S., Dessen Ph., Iwatsubo M. J.* Mol. Biol., 1976, v. 103, № 4, p. 765-784.
49. *Pingoud A., Boehme D., Riesner D., Kownatzki R., Maass G.* Eur. J. Biochem., 1975, v. 56, № 2, p. 617-622.
50. *Krauss C., Römer R., Riesner D., Maass G.* FEBS Lett., 1973, v. 30, № 1, p. 6-10.
51. *Krajewska-Grynkiewicz K., Buonocore V., Schlesinger S.* Biochem. et biophys. acta, 1973, v. 312, № 3, p. 518-527.
52. *Bartman P., Hanke T., Holler E.* Biochemistry, 1975, v. 14, p. 4777-4786.
53. *Holler E., Schwarze G., Scheibl R., Hammer-Raber B.* Biochemistry, 1980, v. 19, № 23, p. 5403-5411.
54. *Knorre D. G., Lavrik O. I.* In: Theory and practice in affinity technique/Eds Sundaram P., Eckstein F. N. Y.: Acad. Press, 1978, p. 169-188.
55. *Knorre D. G., Kisselev L. L.* In: Frontiers in bioorganic chemistry and molecular biology/Ed. Ananchenko S. N. Oxford - New York: Pergamon Press, 1980, p. 315-325.
56. *Ковалева Г. К., Деггарев С. X., Фаворова О. О.* Молекулярн. биология, 1979, т. 13, № 6, с. 1237-1246.
57. *Zinoviev V. V., Rubtsova N. G., Lavrik O. I., Malygin E. G., Akhverdyan V. Z., Favorova O. O., Kisselev L. L.* FEBS Lett., 1977, v. 82, № 1, p. 130-134.
58. *Деггарев С. X., Ковалева Г. К., Зинovieв В. В., Малыгин Э. Г.* Молекулярн. биология, 1981, т. 15, № 1, с. 176-181.
59. *Huafil F., Jacques J., Fayat G., Fromant M., Dessen Ph., Blanquet S.* Biochemistry, 1976, v. 15, № 15, p. 3678-3685.
60. *Fasiolo F., Ebel J.-P., Lazdunsky M.* Eur. J. Biochem., 1977, v. 73, № 1, p. 7-15.
61. *Iborra F., Dorizzi M., Labouesse J.* Eur. J. Biochem., 1973, v. 39, № 2, p. 275-282.
62. *Pimmer J., Holler E.* Biochemistry, 1979, v. 18, № 17, p. 3714-3723.
63. *Киселев Л. Л., Малыгин Э. Г., Ахвердян В. З., Зинovieв В. В.* Докл. АН СССР, 1978, т. 238, № 6, с. 1475-1478.
64. *Rigler R., Pachmann V.* Eur. J. Biochem., 1976, v. 65, № 1, p. 307-315.
65. *Riesner D., Pingoud A., Boehme D., Peters F., Maass G.* Eur. J. Biochem., 1976, v. 68, № 1, p. 74-80.
66. *Knorre D. G.* FEBS Lett., 1975, v. 58, № 1, p. 50-52.
67. *Holler E., Calvin M.* Biochemistry, 1972, v. 11, № 20, p. 3741-3752.
68. *Fersht A. R.* Biochemistry, 1977, v. 16, № 5, p. 1025-1030.
69. *Holler E. J.* Biol. Chem., 1976, v. 251, № 23, p. 7717-7719.
- 69a. *Eldred E. W., Schimmel P. R.* Biochemistry, 1972, v. 11, № 1, p. 17-23.
70. *Helene C., Brun F., Yaniv M. J.* Mol. Biol., 1971, v. 58, № 1, p. 349-365.
71. *Merault G., Graves P. V., Labouesse B., Labouesse J.* Eur. J. Biochem., 1978, v. 87, № 2, p. 541-550.
72. *Maelicke A., Engel G., Cramer F., Staehelin M.* Eur. J. Biochem., 1974, v. 42, № 1, p. 311-314.
73. *Harada K., Wolfe R. G. J.* Biol. Chem., 1968, v. 243, № 15, p. 4123-4130.
74. *Lofffield R. B., Eigner E. A. J.* Biol. Chem., 1969, v. 244, № 7, p. 1746-1754.
75. *Takeda Y., Matsuzaki K.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1974, v. 59, № 4, p. 1302-1310.
76. *Takeda Y., Ogiso Y.* FEBS Lett., 1976, v. 66, № 2, p. 332-335.
77. *Takeda Y., Ohnishi T., Ogiso Y. J.* Biochem., 1976, v. 80, № 3, p. 463-469.

78. Kern D., Giege R. FEBS Lett., 1979, v. 103, № 2, p. 274–281.
- 78а. Яншина Л. Н., Зиновьев В. В., Малыгин Э. Г. Молекулярн. биология, 1980, т. 14, № 6, с. 1396–1405.
79. Jakes R., Fersht A. R. Biochemistry, 1975, v. 14, № 5, p. 3344–3350.
80. Güntner Ch., Holler E. Biochemistry, 1979, v. 18, № 10, p. 2028–2038.
81. Holler E. Biochemistry, 1980, v. 19, № 7, p. 1397–1402.
82. Thiebe R. Nucl. Acids Res., 1978, v. 5, № 6, p. 2055–2071.
83. Berther J.-M., Mayer P., Dutler H. Eur. J. Biochem., 1974, v. 47, № 1, p. 151–163.
84. Pachman U., Zachau H. G. Nucl. Acids Res., 1978, v. 5, № 3, p. 975–985.
85. Godeau J.-M. Eur. J. Biochem., 1980, v. 103, № 1, p. 169–177.
86. Osterberg R., Syöberg B., Rymo L., Lagerkvist U. J. Mol. Biol., 1975, v. 99, № 9, p. 383–400.
87. Zaccai G., Morint Ph., Jacrot B., Moras D., Therry J.-C., Giege R. J. Mol. Biol., 1979, v. 129, № 3, p. 483–500.
88. Kuhlmeier J., Paradis H. H. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1979, v. 88, № 3, p. 1010–1016.
89. Kern D., Potier S., Boulanger Y., Lapointe J. J. Biol. Chem., 1979, v. 254, № 2, p. 518–524.
90. Bruton C. J., Cox L. A. M. Eur. J. Biochem., 1979, v. 100, № 1, p. 301–308.
91. Kern D., Lapointe J. Biochemistry, 1979, v. 18, № 26, p. 5809–5818.
92. Krauss G., Pingoud A., Boehme D., Riesner D., Peters F., Maass G. Eur. J. Biochem., 1975, v. 55, № 3, p. 517–529.
93. Ninio J. Biochimie, 1975, v. 57, № 5, p. 587–595.
94. Дегтярев С. Х., Малыгин Э. Г., Фаворова О. О., Киселев Л. Л. Молекулярн. биология, 1981, т. 15, № 1, с. 170–176.
95. Krauss G., Riesner D., Maass G. Eur. J. Biochem., 1976, v. 68, № 1, p. 81–93.
96. Von der Haar F., Cramer F. Biochemistry, 1978, v. 17, № 21, p. 4509–4514.
97. Fersht A. R., Dingwall C. Biochemistry, 1979, v. 18, № 7, p. 1238–1244.
98. Hopfield J. J., Yamane T., Yue V., Gotts S. M. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1976, v. 73, № 4, p. 1164–1168.
99. Von der Haar F., Cramer F. Biochemistry, 1976, v. 15, № 18, p. 4131–4138.
100. Fersht A. R. In: Transfer RNA: structure, properties and recognition/Eds Schimmel P. R., Söll D., Abelson J. Cold Spring Harbor Laboratory, 1979, p. 247–254.
101. Mulvey R. S., Fersht A. R. Biochem. Soc. Transactions, 1977, v. 5, p. 672–675.
102. Savageau M. A., Freter R. Biochemistry, 1979, v. 18, № 16, p. 3486–3493.
103. Yarus M. In: Transfer RNA: structure, properties and recognition/Eds Schimmel P. R., Söll D., Abelson J. Cold Spring Harbor Laboratory, 1979, p. 501–515.
104. Christiansen J. A. In: Advances in catalysis and related subjects/Eds Frankenburg W. G., Komarewsky V. I., Rideal F. K. N. Y.: Acad. Press, 1954, v. 5, p. 311–355.
105. Knorre D. G., Vlassov V. V. In: Molecular biology biochemistry and biophysics. Chemical recognition in biology/Eds Chapeville F., Haenni A.-L. Berlin – Heidelberg: Springer Verlag, 1980, v. 32, p. 278–300.
106. Schimmel P. R. In: Transfer RNA: structure, properties and recognition/Eds Schimmel P., Söll D., Abelson J. Cold Spring Harbor Laboratory, 1979, p. 297–310.
107. Scheinker V. Sh., Beresten S. F., Degtyarev S. Kh., Kisselev L. L. Nucl. Acids Res., 1979, v. 7, № 3, p. 625–637.
108. Beresten S. F., Favorova O. O., Scheinker V. Sh., Vassilenko S. K., Mashkova T. D., Avdonina T. A., Kisselev L. L. In: Biological Implications of nucleic acid-protein interactions. Poznan: 1980, p. 305–324.
109. Ehrlich R., Lefevre J.-F., Remy P. Eur. J. Biochem., 1980, v. 103, № 1, p. 145–153, 155–159.
110. Lefevre J.-F., Ehrlich R., Kilhoffer M. C., Remy P. FEBS Lett., 1980, v. 114, № 2, p. 219–224.
111. Берестень С. Ф., Шейнкер В. Ш., Бологина И. А., Нурбеков Н. К., Машкова Т. Д., Авдонина Т. А., Киселев Л. Л. Молекулярн. биология, 1981, т. 15, № 4, с. 805–815.
112. Gorshkova I. I., Lavrik O. I. FEBS Lett., 1975, v. 52, № 1, p. 135–138.
113. Childs R. E., Bardsley W. G. J. Theor. Biol., 1975, v. 53, № 2, p. 381–394.
114. Курганов Б. И. Аллостерические ферменты. М.: Наука, 1978, с. 104.
115. Невинский Г. А., Лаврик О. И., Фаворова О. О., Киселев Л. Л. Биоорган. химия, 1979, т. 5, № 3, с. 352–365.
116. Lavrik O. I., Nevinsky G. A. FEBS Lett., 1980, v. 109, № 1, p. 13–17.
117. Kovaleva G. K., Moroz S. G., Favorova O. O., Kisselev L. L. FEBS Lett., 1978, v. 95, № 1, p. 81–84.
118. Kisselev L. L., Favorova O. O., Kovaleva G. K. In: Transfer RNA: structure, properties and recognition/Eds Schimmel P., Söll D., Abelson J. Cold Spring Harbor Laboratory, 1979, p. 235–246.
119. Kisselev L. L., Kovaleva G. K., Favorova O. O., Scheinker V. S., Beresten S. F. In: Enzyme regulation and mechanism of action /Eds Mildner P., Ries B. Oxford: Pergamon Press, 1980, p. 199–210.
120. Bonnet J., Ebel J.-P. FEBS Lett., 1973, v. 39, № 3, p. 259–262.

Поступила в редакцию
7.1.1982

KINETICS AND MECHANISM OF REACTIONS CATALYZED
BY AMINOACYL-tRNA SYNTHETASES

MALYGIN E. G., KISSELEV L. L.

*All-Union Research Institute of Molecular Biology, «Glavmikrobioprom»,
Novosibirsk; Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow*

The characteristics of the reaction mechanism for aminoacyl-tRNA synthetase formation were defined from the detailed kinetic analysis based on statistical assessment of the validity of hypothetical mechanisms, and on use of either substrate analogs, or chemically modified enzyme congeners. A novel type of kinetic analysis of complex reaction was employed, dealing with the ratio of the reaction rates for the formation of various products. The order of binding low molecular weight substrates, ATP and an amino acid, with aminoacyl-tRNA synthetases is a characteristic feature of the enzyme, independent of the substrate substitution for its analogs or blocking half of the active sites. Both positive and negative cooperativity was revealed in the interaction of enzyme active sites with tRNA which determines the ordered catalytic mechanism for the two active sites. A trigger mechanism was proposed for the tryptophanyl-tRNA formation that is in accord with all experimental data, including those on substrate binding, cooperativity and kinetics. A possible discriminating role of center-to-center interactions in enhancing the specificity of aminoacyl-tRNA synthetases was discussed. The data on various aminoacyl-tRNA synthetases were considered with the purpose of unravelling their most general and persistent properties.