



УДК 577.152.611\*20.145 : 577.112.4

ФЕНИЛАЛАНИЛ-тРНК-СИНТЕТАЗА *E. COLI*.  
МОДИФИКАЦИЯ ФЕРМЕНТА ФЛЮОРЕСЦЕНТНЫМИ  
ХИМИЧЕСКИ АКТИВНЫМИ АНАЛОГАМИ НУКЛЕОТИДОВ

Несинский Г. А., Подуст В. Н., Анкилова В. Н.,  
Лаврик О. И.

Новосибирский институт органической химии  
Сибирского отделения Академии наук СССР

Исследована модификация фенилаланил-тРНК-синтетазы *E. coli* флуоресцирующими реагентами — производными 1, N<sup>6</sup>-этноадеозина. Показано, что с помощью смешанных ангидридов εAMP или εADP с мезитиленкарбоновой кислотой не достигается введения флуоресцентных меток в белок. Два других реагента — γ-(*n*-азидоанилид) εATP и εAMP-диальдегид — модифицируют фермент вне активных центров; интенсивность флуоресценции таких меток изменяется при добавлении к ферменту субстратов. Еще один реагент — εATMP — является аффинным реагентом для фермента. Полной инактивации фермента соответствует ковалентное присоединение 4 моль εATMP на 1 моль белка. Субстраты — ATP и εATP защищают фермент от инактивации. Величины  $K_m$  для ATP и фенилаланина, а также величины  $K_{дис}$  комплексов синтетазы с фенилаланином и фенилаланинолом практически не различаются для нативного и глубокомодифицированного фермента (80–85% инактивации). Доступность флуорофора метки, ковалентно связанной с белком, для ионов вода в отсутствие и в присутствии субстратов существенно не отличается от его доступности для свободного εATP. Предполагается, что после образования специфического комплекса εATMP с ферментом образование ковалентной связи с реагентом происходит так, что концевой фосфат молекулы εATP оказывается связанным с нуклеофильной группой активного центра, локализованной вблизи участка связывания α- или β-фосфатных групп нуклеотида. Такое присоединение метки к белку приводит, по-видимому, к разрушению первично образовавшихся специфических контактов εATMP с белком.

В настоящее время для исследования биополимеров широко используются флуоресцентные метки [1]. Наличие целого ряда контролируемых параметров флуоресценции (квантовый выход, время жизни возбужденного состояния, положение и форма спектров, степень поляризации флуоресценции) делает этот метод исследования одним из наиболее информативных.

Большая часть информации о взаимодействии ферментов с субстратами ранее была получена с помощью собственной флуоресценции белков и с помощью зондов типа TNS. Фенилаланил-тРНК-синтетаза *E. coli* (КФ 6.1.1.20) обладает низкой, не чувствительной к присутствию низкомолекулярных субстратов собственной флуоресценцией. TNS взаимодействует с ферментом конкурентно по отношению к фенилаланину [2], поэтому с помощью этого зонда можно исследовать взаимодействие с синтетазой практически только фенилаланина и его аналогов. В связи с этим представлялось интересным введение в фенилаланил-тРНК-синтетазу флуоресцентных меток, не искажающих взаимодействия фермента с субстратами и в то же время чувствительных к присутствию субстратов в титруемой смеси. В качестве флуоресцирующих реагентов мы выбрали производные 1, N<sup>6</sup>-этноадеозина.

Для введения флуоресцентных меток вне субстратсвязывающих центров синтетазы были выбраны γ-(*n*-азидоанилид) εATP и εAMP-диальде-

Сокращения: εAMP — 1, N<sup>6</sup>-этноадеозин-5'-монофосфат; εADP — 1, N<sup>6</sup>-этноадеозин-5'-дифосфат; εATP — 1, N<sup>6</sup>-этноадеозин-5'-трифосфат; εATMP — 1', N<sup>6</sup>-этноадеозин-5'-триметафосфат; εAMP-диальдегид — продукт окисления 1, N<sup>6</sup>-этноадеозин-5'-монофосфата периодатом натрия; TNS — 6-*n*-толуидинонафталин-2-сульфонат калия.

гид. Ранее было показано [3—5], что  $\gamma$ -(*n*-азидоанилид) АТР не блокирует активные центры фенилаланил-тРНК-синтетазы. В то же время при облучении фермента в присутствии этого соединения в высоких концентрациях (выше 5 мМ) наблюдается ковалентное присоединение 10—20 моль реагента на 1 моль белка без существенного уменьшения активности фермента (инактивация составляет не более 10—15%). Аналогичного результата можно было ожидать в случае фотоактивного аналога  $\epsilon$ АТР.

УФ-облучение фермента в присутствии 1 мМ  $\gamma$ -(*n*-азидоанилида)  $\epsilon$ АТР приводило к ковалентному присоединению 3—4 моль реагента на 1 моль белка. Инактивация фермента в реакции аминоацилирования тРНК при этом составляла не более 15%, что указывало на отсутствие модификации фермента по субстратсвязывающим центрам. Скорее всего это объясняется тем, что в активном центре фермента нет подходящего акцептора радикала нитрена. Не исключено также, что ковалентное присоединение аналогов в специфическом комплексе с ферментом происходит, но образовавшаяся ковалентная связь настолько лабильна, что разрушается за время проведения экспериментов по определению активности фермента.

Флуоресценция  $\gamma$ -(*n*-азидоанилида)  $\epsilon$ АТР, как было показано ранее [6], примерно в 20 раз меньше, чем для  $\epsilon$ АТР (за счет стехио-взаимодействия ароматических компонентов в аналоге  $\epsilon$ АТР). Это свойство метка сохраняет и в составе модифицированного белка. Действительно, сравнение флуоресценции раствора модифицированного белка (избыток реагента был удален гелем-фильтрацией) и  $\epsilon$ АТР после его отщепления в результате гидролиза фосфамидной связи по методу [7, 8] также показало возрастание флуоресценции свободной метки примерно в 15 раз.

Добавление к модифицированному аналогом ферменту фенилаланина приводило к тушению флуоресценции, а добавление АТР — к возрастанию флуоресценции на 7—15%. Таким образом, введенная в белок вне активных центров метка чувствительна к присутствию субстратов. По-видимому, конформационные изменения в синтетазе, вызываемые субстратами, влияют на эффективность взаимодействия ароматического радикала при  $\gamma$ -фосфате с флуорофором аналога  $\epsilon$ АТР. Это может быть одной из причин изменения интенсивности флуоресценции метки.

Как было показано ранее [9], в АТР-узлах участках активного центра фенилаланил-тРНК-синтетазы отсутствуют остатки лизина. Инкубация фермента с диальдегидами, полученными при окислении АТР или АМР с помощью периодата натрия, приводит к модификации  $\epsilon$ -аминогруппы остатков лизина вне активного центра фермента. Ковалентное присоединение 2—3 моль реагента на 1 моль белка существенно не изменяет активности фермента. При инкубации фермента с  $\epsilon$ АМР-диальдегидом в присутствии АТР и фенилаланина происходило ковалентное присоединение 1—2 моль аналога  $\epsilon$ АМР. Активность фермента при этом уменьшалась не более чем на 15—20%. Добавление фенилаланина к модифицированному ферменту вызывало тушение, а добавление АТР — возрастание флуоресценции на 7—15%.

Таким образом была исследована возможность введения в фенилаланил-тРНК-синтетазу флуоресцентных меток, не затрагивающих активные центры фермента, но чувствительных к присутствию субстратов. Величины  $K_{\text{асс}}$  комплексов синтетазы с АТР (0,09—0,1 мМ), найденные с помощью этих форм фермента, оказались близкими к величине  $K_m$  для АТР (0,1 мМ).

Синтез фотоактивных этенонуклеотидов, как и  $\epsilon$ АМР-диальдегида и его аналогов, а также введение такого рода меток в белки проводится достаточно просто. В связи с этим все эти реагенты представляют перспективными для введения флуорофоров в ферменты с низкой собственной флуоресценцией и могут оказаться достаточно универсальными.

Производные этеноаденозина и этеноцитозина часто являются субстратами ферментов [1]. В связи с этим полагают, что результаты, полученные с помощью флуоресценции этенонуклеотидов, отражают специфику взаимодействия ферментов с природными нуклеотидами. Введение флуоресцентных нуклеотидных меток в активные центры ферментов может позволить исследовать конформационные перестройки, вызываемые суб-

сгратами [1]. Этот подход также допускает возможность оценки расстояния между центрами связывания различных лигандов [1].

Мы исследовали взаимодействие  $\epsilon$ АМР,  $\epsilon$ АДР и  $\epsilon$ АТР с фенилаланил-тРНК-синтетазой. Первые два соединения оказались конкурентными по отношению к АТР ингибиторами фермента в реакции аминоацилирования тРНК. Величины  $K_i$  для  $\epsilon$ АМР и  $\epsilon$ АДР равны 2 и 4 мМ соответственно.

$\epsilon$ АТР проявлял субстратные свойства в указанной реакции. Однако зависимости скорости реакции от концентрации нуклеотидов в координатах Иди — Хофста для АТР и  $\epsilon$ АТР существенно различаются (рис. 1). Для АТР характерна кривая, которой соответствует одна величина  $K_m$  (0,1 мМ) и одна величина максимальной скорости. В случае  $\epsilon$ АТР скорости реакции аминоацилирования тРНК в зависимости от концентрации нуклеотида соответствуют две величины  $K_m$  (5 и 200 мкМ) и две величины максимальной скорости  $V$  (рис.1), составляющие приблизительно 1 и 2% соответственно от величины  $V$  для АТР.

Малые величины  $V$   $\epsilon$ АТР указывали на возможность проявления субстратных свойств  $\epsilon$ АТР за счет небольшой примеси АТР, хотя две величины максимальной скорости противоречили этому предположению. В связи с этим мы обработали препарат  $\epsilon$ АТР азотистой кислотой в условиях полного превращения АТР в инозин-5'-трифосфат. Ранее было установлено, что ни один из природных нуклеозид-5'-трифосфатов не может заменять АТР в качестве субстрата в реакциях аминоацилирования тРНК [10]. Нами было показано, что инозин-5'-трифосфат не проявляет субстратных свойств в реакции аминоацилирования тРНК<sup>Pro</sup>, катализируемой фенилаланил-тРНК-синтетазой *E. coli*. В то же время для  $\epsilon$ АТР как до, так и после обработки азотистой кислотой были получены одинаковые зависимости скорости реакции от концентрации нуклеотида. Совокупность полученных данных свидетельствовала о способности производных этеноаденозина подобно соответствующим природным нуклеотидам — АМР, АДР и АТР — эффективно взаимодействовать с фенилаланил-тРНК-синтетазой.

$\epsilon$ АМР,  $\epsilon$ АДР и  $\epsilon$ АТР можно было рассматривать как потенциальные лиганды для создания на их основе химически активных аффинных реагентов для модификации фенилаланил-тРНК-синтетазы. Как было установлено ранее, смешанные ангидриды АМР или АДР и мезитиленкарбоновой кислоты являются аффинными реагентами для триптофил-тРНК-синтетазы из поджелудочной железы быка [11] и лейцил-тРНК-синтетазы *Euglena gracilis* [12]. Однако инкубация фенилаланил-тРНК-синтетазы *E. coli* с соответствующими смешанными ангидридами  $\epsilon$ АМР и  $\epsilon$ АДР в концентрациях до 5 мМ в течение 0,5–0,7 ч не приводила к заметной инактивации фермента. Сравнение флуоресценции нативного фермента и фермента после инкубации со смешанным ангидридом  $\epsilon$ АМР и мезитиленкарбоновой кислоты (избыток реагента был удален гель-фильтрацией) показало, что флуоресцентная метка не включается в состав белка.

Ранее было показано, что аффинным реагентом фенилаланил-тРНК-синтетазы *E. coli* [13] и ДНК-зависимой РНК-полимеразы *E. coli* [14] является аденозин-5'-триметафосфат. Это соединение не содержит дополнительных группировок и может служить «эндоеаффинным» реагентом, ковалентное присоединение которого должно происходить по нуклеофильным группам АТР-связывающих центров ферментов. Нами было исследовано влияние этеноаденозин-5'-триметафосфата ( $\epsilon$ АТМР) на активность фенилаланил-тРНК-синтетазы. Инкубация синтетазы с этим реагентом в концентрации 2–6 мМ приводила к глубокой инактивации (70–90%) фермента (рис. 2). Добавление АТР в концентрации, равной концентрации реагента, способствовало некоторой защите фермента от инактивации.  $\epsilon$ АТР проявлял защитный эффект, сравнимый с эффектом АТР. Защитный эффект нуклеотидов возрастал при увеличении их концентрации в реакционной смеси.

Была исследована флуоресценция метки после ковалентного присоединения к белку и отщепления ее от белка с помощью кислого гидролиза. Оказалось, что интенсивность флуоресценции  $\epsilon$ АТР не изменяется после ковалентного присоединения к ферменту по сравнению с флуоресценцией

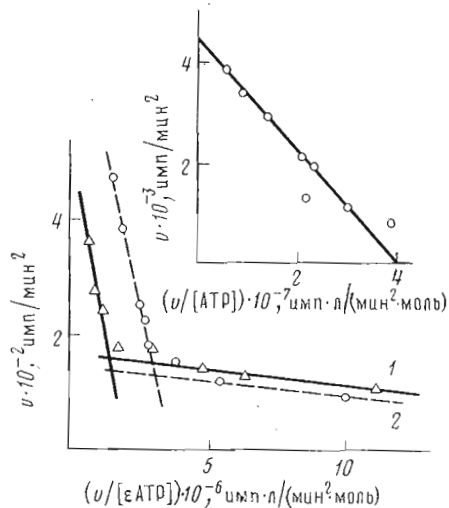


Рис. 1

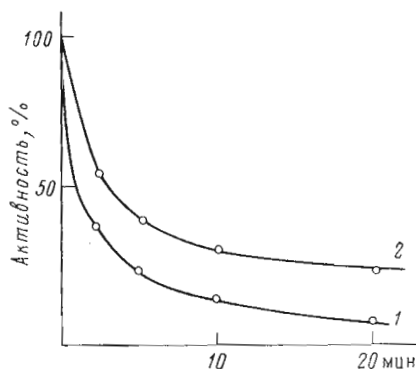


Рис. 2

Рис. 1. Зависимость скорости реакции аминокислотирования тРНК<sup>phe</sup> от концентрации εАТР (на вставке — от концентрации АТР): 1 и 2 — препараты εАТР до и после обработки азотистой кислотой соответственно. Фермент использовали в концентрации 1–2 мкг/мл в случае АТР и 5–10 мкг/мл в случае εАТР

Рис. 2. Кинетические кривые инактивации фенилаланил-тРНК-синтетазы с помощью εАТМР (4 мМ) в отсутствие (1) и в присутствии (2) АТР (5 мМ)

свободной εАТР в растворе. Стехиометрия ковалентного присоединения этаноанолага к ферменту была оценена равной 2 и 3,8 моль εАТМР на 1 моль белка при инактивации фермента на 50 и 85% соответственно. Методом экстраполяции было установлено, что 100%-ной инактивации белка должно соответствовать ковалентное присоединение 4 моль реагента на 1 моль белка. Полученные данные указывали на то, что при полной инактивации белка ковалентному блокированию подвергаются оба каталитических центра функционального димера. Потенциально возможными участками присоединения двух других остатков εАТР могли быть два эффекторных центра фермента [3–5] или два участка связывания концевого остатка аденозина молекулы тРНК [9]. Этот вопрос специально не исследовался.

Процесс модификации фенилаланил-тРНК-синтетазы с помощью εАТМР в целом удовлетворял критериям аффинной модификации биополимеров, описанным, например, в работах [15–16]. Эти критерии отражают первый этап аффинной модификации — формирование специфического комплекса между ферментом и реагентом и образование ковалентной связи. Однако после образования ковалентной связи характер взаимодействия между аффинным реагентом и белком может существенно измениться, что имеет важное значение при использовании метода аффинной модификации для функциональных исследований.

Если наличие ковалентной связи между εАТР и фенилаланил-тРНК-синтетазой не искажает структуру специфического комплекса фермента с аналогом, то должны сохраняться характерные для синтетаз кооперативные взаимодействия между центрами связывания АТР и аминокислоты. В связи с этим мы исследовали взаимодействие фенилаланил-тРНК-синтетазы, инактивированной с помощью εАТМР на 80–90%, с АТР и фенилаланином (рис. 3). Оказалось, что величины  $K_m$  для субстратов в случае нативного и модифицированного белков практически не различаются. Это могло указывать на отсутствие влияния нуклеотидной метки на средство АТР и фенилаланина к свободным центрам фермента. Поскольку величины  $K_m$  являются грубыми показателями средства лигандов к ферментам, мы попытались определить величины  $K_{днс}$  комплексов модифицированного фермента с субстратами. Было показано, что добавление АТР, фенилаланина и тРНК к модифицированному ферменту не приводит к изменению

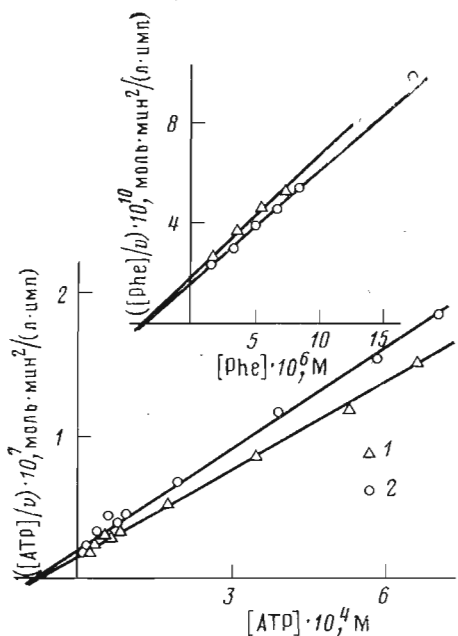


Рис. 3

Рис. 3. Зависимость скорости реакции аминоацелирования тРНК<sup>Phe</sup> от концентрации АТФ (на вставке — от концентрации фенилаланина). 1 — нативный фермент, 2 — фермент, инактивированный с помощью εАТМР на 85%

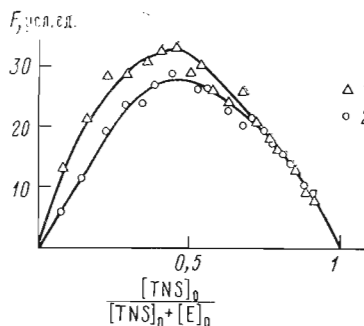


Рис. 4

Рис. 4. Зависимость интенсивности флуоресценции комплекса фенилаланил-тРНК-синтетазы с TNS от отношения концентрации TNS к сумме концентраций TNS и фермента для нативного (1) и инактивированного (на 80–85%) с помощью εАТМР препаратов фермента (2)

флуоресценции ковалентно связанной метки. В связи с этим для флуориметрического титрования модифицированного εАТМР фермента был использован зонд TNS. Кривые зависимости относительной флуоресценции комплекса фермент-TNS от отношения концентрации TNS к сумме концентраций TNS и фермента (рис. 4) для препаратов нативного и модифицированного εАТМР фермента имеют максимумы при значениях величины на оси абсцисс, близкой к 0,5, что соответствует, согласно работе [2], стехиометрии комплекса фермента с зондом, равной 1:1. Таким образом модификация синтетазы εАТМР не вызывала изменения стехиометрии комплекса между белком и зондом. Исходя из этого, следовало полагать что изменение флуоресценции комплекса модифицированного фермента (80–90% инактивации) с TNS должно отражать взаимодействие всех форм (модифицированных наполовину или полностью) фермента со специфическими лигандами.

При титровании фермента фенилаланином и его аналогами можно было ожидать увеличения сродства этих лигандов к модифицированному ферменту по сравнению с нативным белком. Так, в работе [17] показано, что фенилаланин связывается в 20 раз лучше с фенилаланил-тРНК-синтетазой в комплексе с аденозином. Величина  $K_{дис}$  комплекса фермента с фенилаланинолом уменьшается в 300 раз, если нуклеотидсвязывающий участок занят молекулой АТФ. В синергическое связывание нуклеотидных и аминокислотных лигандов с фенилаланил-тРНК-синтетазой вовлечены не только помощительно и отрицательно заряженные группировки, но также гидрофобный радикал фенилаланина, остаток рибозы и пуриновое основание в молекуле АТФ [18].

Была исследована зависимость флуоресценции TNS, связанного с белком, от концентрации фенилаланина и фенилаланинола в титруемой смеси для нативного и модифицированного фермента. Величины  $K_{дис}$ , полученные с помощью кривых флуоресцентного титрования, приведены в табли-

Величины  $K_{дис}$  комплексов фенилаланил-тРНК-синтетазы с фенилаланином (А) и фенилаланинолом (Б)

Препараты фермента	А, мкМ	Б, мМ
Нативный	30±15	1,0±0,5
Модифицированный *	20±10	1,5±0,5

\* Модификация  $\epsilon$ АТМР, 80–85% инактивации.

це. Видно, что величины  $K_{дис}$  комплексов фенилаланина и фенилаланинола с нативным и модифицированным препаратами фермента практически не различаются и хорошо согласуются с опубликованными в литературе аналогичными параметрами для фенилаланил-тРНК-синтетазы [17]. Отсутствие различий в величинах  $K_m$  для субстратов и особенно величин  $K_{дис}$  комплексов фермента с лигандами в случае нативного и модифицированного ферментов может указывать на отсутствие влияния аффинной метки на связывание лигандов в пределах одного, а также и разных активных центров функционального димера. Таким образом, несмотря на то что ковалентное присоединение  $\epsilon$ АТМР к синтетазе протекает в соответствии с критериями аффинной модификации биополимеров, аффинная метка не влияет на взаимодействие фермента с другими субстратами. Это может быть следствием нарушения правильного взаимодействия реагента с белком после образования ковалентной связи между аналогом и ферментом.

В связи с этим следует отметить, что взаимодействие нуклеозид-5'-триметафосфатов с нуклеофильными группами в растворе приводит к раскрытию цикла и образованию только  $\gamma$ -производных нуклеозидтрифосфатов [19]. В работе [20] исследована оптимальная конформация трифосфатной группировки АТР в комплексе с фенилаланил-тРНК-синтетазой из дрожжей, а в работах [21, 22] — с ДНК- и РНК-полимеразами *E. coli*. Показано, что трифосфатная группа АТР вытянута в линейную цепь, которая стабилизируется за счет взаимодействия  $\gamma$ - и  $\beta$ -фосфатных группировок с ферментом посредством иона магния, а  $\alpha$ - и  $\beta$ -фосфатных группировок — за счет дополнительного взаимодействия с другими группами белка. В случае образования комплекса  $\epsilon$ АТМР с фенилаланил-тРНК-синтетазой та фосфатная группа аналога  $\epsilon$ АТР, которая после размыкания триметафосфатного цикла станет концевой,  $\gamma$ -фосфатной, должна быть сближена с участком активного центра фермента, контактирующим в случае комплекса фермент-АТР с  $\alpha$ - или  $\beta$ -, но не с  $\gamma$ -фосфатной группой. Если ковалентное присоединение реагента происходит в участке локализации  $\alpha$ - или  $\beta$ -фосфатных групп, раскрытие цикла может привести к смещению пуринового основания нуклеотида относительно его специфических участков связывания (рис. 5).

На рис. 6 представлены кривые зависимости тушения флуоресценции  $\epsilon$ АТР от концентрации ионов пода в модифицированных координатах Штерна — Фолмера. Константы Штерна — Фолмера, рассчитанные по величине отрезков, отсекаемых на оси абсцисс, равны:  $140 \text{ M}^{-1}$  для свободного  $\epsilon$ АТР в растворе;  $80 \text{ M}^{-1}$  для ковалентно связанного с ферментом  $\epsilon$ АТР в отсутствие других лигандов, а также в присутствии АТР или фенилаланина;  $50 \text{ M}^{-1}$  в присутствии тРНК. Из этих данных следует, что флуорофор метки легко доступен для ионов пода как в отсутствие, так и в присутствии малых лигандов синтетазы, в то время как в других белковых системах, например G-актине,  $\epsilon$ АТР полностью недоступен для молекул тушителей флуоресценции [23]. Незначительное экранирующее действие тРНК, наблюдаемое в нашем случае, вероятно, может быть следствием большого размера этой молекулы или вызываемыми тРНК конформационными перестройками синтетазы [24]. Отсутствие заметного экранирования флуорофора  $\epsilon$ АТР после ковалентного присоединения нуклеотида к ферменту может свидетельствовать в пользу предположения о смещении аналога относительно участков специфических контактов нуклеотида с белком.

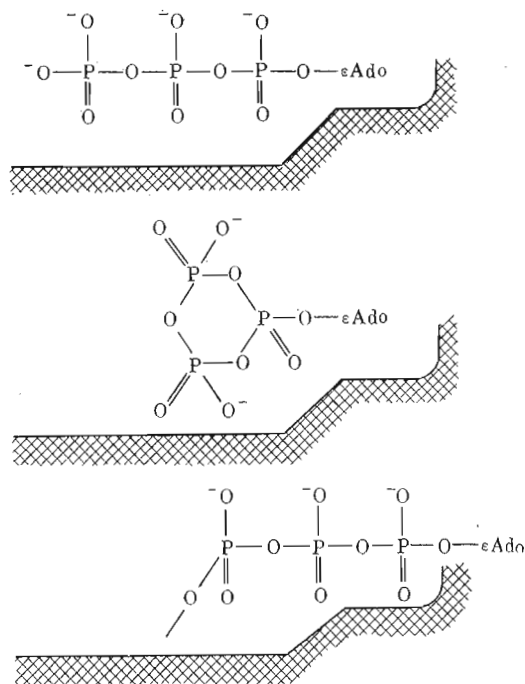


Рис. 5. Схема аффинной модификации фенилаланил-тРНК-синтетазы с помощью  $\epsilon$ АТМР. Предполагается смещение основания нуклеотида относительно его участка специфического связывания на ферменте после образования ковалентной связи с белком

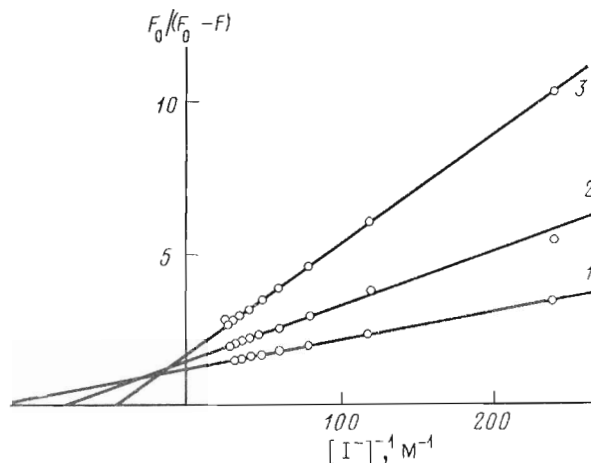


Рис. 6. Тушение флуоресценции  $\epsilon$ АТР ионами йода (в модифицированных координатах Штерна — Фолмера): 1 —  $\epsilon$ АТР в растворе; 2 —  $\epsilon$ АТР, ковалентно связанный с ферментом, в отсутствие лигандов; 3 — в присутствии тРНК<sup>Phc</sup>

Совокупность полученных данных не противоречит схеме аффинной модификации, согласно которой ковалентное присоединение  $\epsilon$ АТМР приводит к нарушению первично образовавшихся специфических контактов аффинного реагента с белком. Аналогичный эффект нарушения специфических контактов возможен также при модификации других нуклеотидзависимых ферментов с помощью АТМР, что, однако, не исключает использования последнего для локализации участков связывания АТР на субъединицах олигомеров и определения модифицируемых групп активных центров белков. Применение таких реагентов, по-видимому, невозможно в случае исследования кооперативных взаимодействий субстратов с ферментами.

УФ-спектры регистрировали на спектрофотометре Specord UV VIS (ГДР). Флуоресцентные измерения проводили на приборе Hitachi MPF-2A (Япония). ТСХ осуществляли на стандартных пластинках Silufol UV<sub>R</sub> (Kavalier, СССР) в системе этанол — 1 М ацетат аммония (рН 7,5), 7 : 3 (А); диоксан — конц. аммиак — вода, 6 : 2 : 4 (Б). Микроколоночную хроматографию проводили на колонках с микрогранулированной DEAE-целлюлозой DE-41 (Whatman, Англия), элюируя ступенчатым градиентом концентрации КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub> (рН 7,5) в 7 М мочевины. Профили элюции при хроматографии регистрировали с помощью микроспектрофотометра «Обь» производства НИОХ СО АН СССР.

Использовали [<sup>14</sup>С]фенилаланин (360 Ки/моль, UVVVR, СССР), фенилаланин (Reanal, Венгрия), TNS (Serva, ФРГ); α,β-дибромэтилацетат предоставлен Р. И. Гвоздевым (ИХФ АН СССР, Черноголовка); диметилсульфоксид и мезитиленкарбонилхлорид (отечественного производства) очищены перегонкой в вакууме; пиридинийхлорид получали пропуская сухой HCl через абсолютный пиридин. Остальные реагенты были квалификации х. ч. и ос. ч.

Суммарная тРНК была выделена из *E. coli* MRE-600 по методу Саудахчисва и др. [25] и содержала 1,2% тРНК<sup>Phe</sup> по акцепторной активности.

Фенилаланил-тРНК-синтетаза была получена из *E. coli* MRE-600 по методу Штальберга [26]. Препарат фермента был 90–95% чистоты по данным электрофореза в полиакриламидном геле. Активность препаратов фермента составляла 400–500 ед. акт./мг (за 1 ед. акт. принимали количество белка, катализирующее включение 1 нмоль [<sup>14</sup>С]фенилаланина в тРНК за 1 мин при 25°С).

Синтез εАТР проводили согласно методике, разработанной Р. И. Гвоздевым, с некоторыми модификациями. К раствору 5 ммоль АТР в 25 мл воды добавляли 15 ммоль α,β-дибромэтилацетата и перемешивали при 20°С и рН 5,5 (рН доводили 1 М NaOH, контроль каждые 30 мин в течение 7 ч). Через 24 ч добавляли еще 3 ммоль α,β-дибромэтилацетата. Смесь оставляли при интенсивном перемешивании на 6 ч. За полнотой реакции следили по уменьшению отношения величины  $A_{260}/A_{275}$ . После окончания реакции (всего примерно 30 ч) смесь вливали в 50 мл холодного ацетона, содержащего 0,5% LiClO<sub>4</sub>. Смесь охлаждали до 0°С, выпавший осадок отделяли центрифугированием (4000 об/мин, 15 мин), промывали холодным ацетоном (2×75 мл) и сушили в вакууме. Выход суммарного препарата εАТР составил 3,1 г.

Суммарный препарат εАТР (1 г) растворяли в 75 мл воды и наносили на колонку (4×50 см) с сефадексом А-50 (Cl<sup>-</sup>). Элюцию продукта проводили раствором LiCl (рН 7,5, линейный градиент концентрации от 0 до 0,15 М, общий объем 3 л, объем фракции 10 мл, скорость элюции 30 мл/ч). Фракции, соответствующие εAMP, εADP и εАТР, упаривали в вакууме при 30°С до объема 1 мл и каждую из них вливали в 75 мл 0,5% раствора LiClO<sub>4</sub> в холодном ацетоне. Полученные смеси охлаждали до 0°С, выпавшие осадки отделяли центрифугированием, промывали тремя порциями холодного ацетона по 75 мл и сушили в вакууме. Выход литиевой соли εАТР составил 0,6 г (60%), а литиевых солей εAMP и εADP — приблизительно по 30–100 мг. Согласно данным МНХ, препараты εAMP и εADP были гомогенными, препарат εАТР содержал не менее 98% основного вещества. В качестве примесей в препарате εАТР присутствовали εAMP и εADP. Характеристики УФ-спектров и данные ТСХ для полученного нами εАТР совпадали с характеристиками контрольного препарата фирмы P-L Biochemicals (США). Для устранения возможной примеси АТР (~1–2%) мы провели обработку препарата εАТР азотистой кислотой в условиях превращения АТР в ITP согласно методике [27]. К раствору 26 мг εАТР в 1 мл 2 М Na-ацетатного буфера (рН 3,75) добавляли 0,17 мл 4 М NaNO<sub>2</sub>. Смесь инкубировали при 20°С в течение 22 ч, а затем к ней добавляли 10 мл холодного ацетона. Выпавший осадок отделяли центрифугированием, промывали двумя порциями этанола по 10 мл, сушили в вакууме, раство-



ряли в 1 мл воды и наносили на колонку с DEAE-целлюлозой (НСО<sub>3</sub><sup>-</sup>-форма; 0,5×15 см). Продукт элюировали при 10° С триэтиламмоний-бикарбонатным буфером (линейный градиент концентрации 0–0,33 М; общий объем 10 мл).

Синтез  $\gamma$ -(*n*-азидоанилида)  $\epsilon$ АТР описан ранее [8].  $\epsilon$ АМР-диальдегид получали окислением  $\epsilon$ АМР периодатом натрия согласно [28]. Синтез смешанных ангидридов  $\epsilon$ АМР (и  $\epsilon$ АДР) и мезитиленкарбонической кислоты проводили по аналогии с работой [29], используя реакцию нуклеотидов с мезитиленкарбонилхлоридом. Продукты были гомогенными согласно данным ТСХ в системах А и Б и данным МКХ. Спектральные характеристики совпадали с описанными в работе [29].

$\epsilon$ АТМР получали по аналогии с синтезом АТМР [19] с некоторыми модификациями. К 66 мкл 0,07 М раствора триэтиламмонийной соли  $\epsilon$ АТР в диметилсульфоксиде добавляли 40 мкл 1,5 М раствора N,N'-дициклогексилкарбодиимида и 15 мкл 0,06 М раствора пиридинийхлорида в этом же растворителе. Смесь инкубировали при 20° С, периодически встряхивая. Для определения полноты реакции через 1 ч после начала реакции отбирали аликвоту (5 мкл) и добавляли к ней 0,1 мл 0,5 М раствора гексаметилендиамина. Через 20 мин состав смеси анализировали с помощью метода МКХ. Было найдено, что после 1 ч инкубации смесь содержала более 80–85%  $\epsilon$ АТМР. Через 1,5 ч после начала реакции 20–100 мкл реакционной смеси переносили в сухую пробирку и добавляли 10 мл абс. диэтилового эфира. Выпавший осадок трижды промывали 10 мл эфира. К сухому осадку добавляли 0,3 мл раствора фермента (0,25–0,4 мг/мл), предварительно подвергнутого гель-фильтрации на колонке с сефадексом G-100, уравновешенным буфером 0,05 М трис-НСl, 0,01 М MgCl<sub>2</sub>, рН 7,5. В ходе реакции модификации из раствора отбирали аликвоты 1–3 мкл и вносили в 0,2 мл реакционной смеси для определения активности фермента. Степень инактивации находили из соотношения начальных скоростей реакции аминоацилирования до и после модификации фермента.

Стехиометрию связывания метки с ферментом определяли после отделения избытка реагента с помощью гель-фильтрации на колонке (0,4×30 см) с сефадексом G-100, промытым водой. К 120 мкл 5 мкМ раствора фермента после гель-фильтрации добавляли 70 мкл 2 н. НСl. В качестве контроля использовали 120 мкл раствора  $\epsilon$ АТР, к которому добавляли 70 мкл раствора НСl. После полного гидролиза (~24 ч, 25° С) опытный и контрольный растворы подщелачивали 35 мкл 4 н. КОН, центрифугировали (4000 об/мин, 15 мин) для удаления денатурированного белка, из супернатанта отбирали по 0,2 мл и измеряли интенсивность флуоресценции в пробах. Концентрацию метки ( $c_m$ ) в растворе, соответствующем модифицированному ферменту, рассчитывали по формуле

$$c_m = c_{\epsilon\text{АТР}} \cdot F_m / F_{\epsilon\text{АТР}},$$

где  $F_m$  — флуоресценция раствора, соответствующего модифицированному ферменту;  $c_{\epsilon\text{АТР}}$  и  $F_{\epsilon\text{АТР}}$  — концентрация и уровень флуоресценции  $\epsilon$ АТР в контрольной пробе. При расчете стехиометрии ковалентного присоединения метки к ферменту концентрацию фермента определяли спектрофотометрически, используя величину молекулярной массы синтетазы 288 000 и  $A_{1\text{мг}}^{1\text{см}} = 0,94$ .

Активность фенилаланил-тРНК-синтетазы в реакции аминоацилирования тРНК определяли согласно [4]. Реакционная смесь объемом 0,2 мл содержала: 10 мМ MgCl<sub>2</sub>; 50 мМ трис-НСl-буфер, рН 7,5; 50 мкг/мл бычьего сывороточного альбумина; 2 мМ АТР; 2 нМ тРНК<sup>Phe</sup>; 25 мкМ [<sup>14</sup>С]фенилаланин; 1–2 мкг/мл фенилаланил-тРНК-синтетазы.

При определении величин  $K_m$  для фенилаланина, АТР,  $\epsilon$ АТР концентрации этих субстратов варьировали в диапазонах 2–16, 10–700 и 10–500 мкМ соответственно.

Через равные промежутки времени (15–20 с) из реакционной смеси отбирали пробы 20–30 мкл и наносили на мишени из бумаги FN-16 размером 3×3 см, пропитанные 5% раствором трихлоруксусной кислоты

(ТХУ). Мишени промывали 10% ТХУ, трижды 5% ТХУ и высушивали. Радиоактивность измеряли на счетчике Mark-II (Nuclear Chicago, США) с использованием толуольного сцинтиллятора.

Стехиометрию связывания фермента с TNS исследовали методом, описанным в работе [2].

Величины  $K_{дис}$  комплексов фермента с фенилаланином и фенилаланинолом с помощью TNS определяли по аналогии с работой [2]. Титруемая смесь объемом 0,25 мл содержала 0,7–1,0 мкМ синтетазу, 0,05 М трис-HCl (рН 7,5), 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мкМ TNS. Разбавление смеси учитывали экспериментально в контрольном титровании. Величины  $K_{дис}$  определяли графически из тангенса угла наклона кривой тушения флуоресценции в координатах Бенеси-Хилдербранда [30]. Величины  $K_{дис}$  также были оценены непосредственно из экспериментальных кривых с помощью ЭВМ по уравнению [31]

$$\Delta F = \Delta F_{\infty} \left[ \frac{1 + nKc + K[E]}{2K[E]} - \left( \left( \frac{1 + nKc + K[E]}{2K[E]} \right)^2 - \frac{nc}{[E]} \right)^{\frac{1}{2}} \right].$$

где  $K_{дис} = n/K$ ;  $\Delta F$  — изменение флуоресценции системы при концентрации лиганда  $c$ ;  $\Delta F_{\infty}$  — изменение флуоресценции системы при насыщающей концентрации лиганда;  $1/n$  — число участков связывания лиганда;  $K$  — константа ассоциации лиганда с участком фермента;  $[E]$  — концентрация фермента в титруемой смеси.

Эксперименты по тушению флуоресценции  $\epsilon$ АТР ионами иода проводили по аналогии с работой [7]. Титруемая смесь объемом 0,25 мл содержала 1–3 мкМ  $\epsilon$ АТР (или метки, ковалентно связанной с ферментом), 0,05 М трис-HCl (рН 7,5), 10 мМ MgCl<sub>2</sub>. Титрование проводили 1 М раствором иодистого калия. Эффективность тушения флуоресценции ионами иода определяли с помощью модифицированного уравнения Штерна — Фолмера [32]:

$$\frac{F_0}{F_0 - F} = \frac{1}{aK} \cdot \frac{1}{c} + \frac{1}{a},$$

где  $F_0$  — начальное значение флуоресценции;  $F$  — значение флуоресценции, соответствующее данной концентрации тушителя  $c$ ;  $a$  — доля флуоресценции флуорофора от общего уровня флуоресценции;  $K$  — константа Штерна — Фолмера.

Авторы работы глубоко признательны И. И. Горшковой за расчет величин  $K_{дис}$  с помощью ЭВМ, С. А. Зыкову и Н. А. Зыковой за проведение ряда экспериментов, проф. Д. Г. Кворре за постоянный интерес и внимание к работе.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Иванов М. В., Костр А. А. Успехи биологической химии, М., 1980, т. 21, с. 112–129.
2. Hoiler E., Kosakowsky H. M. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1973, v. 54, № 4, p. 1532–1539.
3. Lovrik O. I., Nevinsky G. A. FEBS Lett., 1980, v. 109, № 1, p. 13–17.
4. Лаврик О. И., Невинский Г. А., Рязанкин И. А. Молекулярн. биология, 1979, т. 13, № 5, с. 1001–1010.
5. Невинский Г. А. Модификация аминокцил-tРНК-синтез химически активными аналогами нуклеотидов. Дис. ... канд. хим. наук. МГУ. М.: Изд-во МГУ, 1979.
6. Невинский Г. А., Денисов А. Ю. Биоорган. химия, 1981, т. 7, № 14, с. 1693–1708.
7. Денисов А. Ю., Невинский Г. А., Лаврик О. И. Биохимия, 1982, т. 47, вып. 2, с. 184–190.
8. Денисов А. Ю., Невинский Г. А., Лаврик О. И. Биоорган. химия, 1982, т. 8, № 1, с. 72–79.
9. Горшкова И. И., Даций И. А., Лаврик О. И., Невинский Г. А. Биохимия, 1981, т. 46, вып. 4, с. 699–707.
10. Фаворова О. О., Парин А. В., Лаврик О. И. В сб.: Итоги науки и техники. Сер. Биофизика. М.: ВИНТИ, 1972, т. 2, с. 6–100.

11. Ковалева Г. К., Иванюв Л. Л., Мадони Н. А., Фаворова О. О., Северин Е. С., Гуляев Л. Н., Соколова Н. И., Шабарова З. А., Киселев Л. Л. Биохимия, 1978, т. 43, № 3, с. 525-534.
12. Краусне Р., Ковалева Г. К., Гуляев Н. Н., Баранова Л. А., Агапарова М. Б., Северин Е. С., Соколова Н. И., Шабарова З. А., Киселев Л. Л. Биохимия, 1978, т. 43, № 4, с. 656-662.
13. Ходырева С. Н., Анкилова В. Н., Лаврик О. И. Тез. докл. на IV Всес. конф. Рига, 1982, ч. 1, с. 99-100.
14. Смирнов Ю. В., Линкин М. В., Овчинников Ю. А., Грачев М. А., Мустаев А. А. Биоорган. химия, 1981, т. 7, № 7, с. 1113-1116.
15. Knorre D. G., Lavrik O. I. In: Theory and practice in affinity techniques. London - New York - San Francisco: Acad. Press, 1978, p. 169-189.
16. Ankiлова V. N., Knorre D. G., Kravchenko V. V., Lavrik O. I., Nevinsky G. A. FEBS Lett., 1975, v. 60, p. 172-175.
17. Holler E., Bartmann P., Hanke T., Kosakowski H. M. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1973, v. 53, № 4, p. 1205-1212.
18. Holler E., Hammer-Raber B., Hanke T., Bartmann P. Biochemistry, 1975, v. 14, № 11, p. 2496-2503.
19. Knorre D. G., Kurbatov V. A., Samukov V. V. FEBS Lett., 1976, v. 40, № 1, p. 105-108.
20. Connolly B. A., von der Haar F., Eckstein F. J. Biol. Chem., 1980, v. 255, № 23, p. 11301-11307.
21. Burgers P. M. J., Eckstein F. J. Biol. Chem., 1979, v. 254, № 15, p. 6889-6893.
22. Armstrong V. W., Yee D., Eckstein F. Biochemistry, 1979, v. 18, № 19, p. 4120-4123.
23. Harvey S. C., Cheung H. C. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1976, v. 73, № 4, p. 865-868.
24. Ehrlich R., Lefevre J.-F., Remy P. Eur. J. Biochem., 1980, v. 103, № 1, p. 145-153, 155-159.
25. Сандишчиев Л. С., Старостина В. К., Стефанович Л. Е., Чуцаев В. В. Молекулярн. биология, 1967, т. 1, вып. 4, с. 463-466.
26. Stulberg M. P. J. Biol. Chem., 1967, v. 242, № 5, p. 1060-1064.
27. Shapiro R., Pohl S. H. Biochemistry, 1968, v. 7, № 1, p. 448-455.
28. Невинский Г. А., Газарянц М. Г., Мкртчян З. С. Биоорган. химия, 1983, т. 9, № 4, с. 487-495.
29. Третьякова С. С., Ермолин С. В., Шаламберидзе М. В., Соколова Н. И., Шабарова З. А. Биоорган. химия, 1978, т. 4, № 12, с. 1627-1630.
30. Holler E., Bennet E. L., Calvin M. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1971, v. 45, № 2, p. 409-415.
31. Engel G. Anal. Biochem., 1974, v. 61, № 1, p. 184-191.
32. Бурштейн Э. А. В сб.: Итоги науки и техники. сер. Биофизика. М.: ВИНТИ, 1977, т. 7, с. 139-141.

Поступила в редакцию  
22.XII.1982

## PHENYLALANYL-tRNA SYNTHETASE FROM *E. COLI*: ENZYME MODIFICATION BY CHEMICALLY REACTIVE ANALOGS OF FLUORESCENT NUCLEOTIDES

NEVINSKY G. A., PODUST V. N., ANKILOVA V. N., LAVRIK O. I.

*Novosibirsk Institute of Organic Chemistry, Siberian Branch  
of the Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk*

Modification of phenylalanyl-tRNA synthetase by mixed anhydride of mesitylene-carboxylic acid and  $\epsilon$ AMP (I) or  $\epsilon$ ADP (II),  $\epsilon$ ATP  $\gamma$ -(*p*-azidoanilide) (III), 2',3'-dialdehyde derivative of  $\epsilon$ AMP (IV) and 1,N<sup>6</sup>-ethenoadenosine-5'-trimethaphosphate was investigated. No covalent attachment of fluorescent label to the enzyme was observed with compounds (I) and (II). The compounds (III) and (IV) failed to modify the enzyme active sites. The fluorescence of such labels is sensitive to the presence of substrates. 1,N<sup>6</sup>-ethenoadenosine-5'-trimethaphosphate (V) was shown to be the affinity reagent for synthetase. The extent of modification equal to 4 moles of analog per mole of protein corresponds to the complete inactivation of the enzyme. The substrates, ATP and  $\epsilon$ ATP, protect the enzyme against inactivation. The  $K_m$  values for ATP or Phe as well as  $K_d$  values for the synthetase complexes with Phe or phenylalaninol, are the same for the native and modified enzymes. The fluorophore accessibility to I<sup>-</sup> ions does not differ considerable from that of free  $\epsilon$ ATP either in presence or in absence of ligands. The formation of the covalent bond between the affinity reagent (V) and the protein is assumed to disturb the specific contacts formed at first by the nucleotide analog with the enzyme.