



УДК 577.152.273*2.042

АФФИННАЯ МОДИФИКАЦИЯ КРЕАТИНКИНАЗЫ
ИЗ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ КРОЛИКА
 γ -АМИДОМ АТР — ПРОИЗВОДНЫМ АЗОТИСТОГО ИПРИТА

Невинский Г. А., Газарянц М. Г.,* Лаврик О. П.

Новосибирский институт органической химии Сибирского отделения
Академии наук СССР; * Институт экспериментальной биологии
Академии наук АрмССР, Ереван

Исследована модификация креатинкиназы с помощью γ -(N-(2-хлорэтил)-N-метил)амида АТР. Полной инактивации фермента соответствует ковалентное присоединение 1,7–1,8 моль аналога на 1 моль функционального димера. Субстраты АТР и АДФ полностью защищают фермент от инактивации и ковалентного присоединения аналога к киназе. Скорость модификации фермента зависит от концентрации реагента, ионов магния и рН реакционной смеси. Оценены величины K_d обратимого связывания аналога с креатинкиназой (1,0 и 1,5 мМ) и константы максимальной скорости необратимой модификации фермента ($2,1 \cdot 10^{-3}$ и $1,2 \cdot 10^{-3}$ с $^{-1}$) в отсутствие и присутствии ионов магния. Показано, что неидентичные М- и М'-субъединицы фермента модифицируются аналогом АТР с разной скоростью. В обеих субъединицах ковалентному блокированию подвергаются остатки аминокислот с рК 7,7. Сделано предположение, что алкилированию подвергается имидазольное кольцо остатка гистидина, выполняющего роль общего кислотно-основного катализатора при депротонировании гуанидиневого группировки креатина в процессе фосфорилирования последнего АТР.

Креатинкиназа (АТР: креатинфосфотрансфераза, КФ 2.7.3.2) катализирует обратимую реакцию переноса фосфорильного остатка с Mg^{2+} -АТР на креатин. Фермент с молекулярной массой 82 000 состоит из двух неидентичных субъединиц примерно с одинаковой молекулярной массой [1, 2]. Одна из субъединиц фермента катализирует прямую реакцию (фосфорилирование креатина) с максимальной скоростью при рН реакционной среды 8,5–9,5, а обратную реакцию — при рН 7,5–8,0. Вторая субъединица киназы проявляет максимальную активность в прямой реакции при рН 5,5–5,7, а в обратной реакции — при рН 5,0 и меньше [1, 2]. В работах [1, 2] мы предложили называть первую субъединицу белка М-субъединицей, а вторую — М'-субъединицей.

Ранее для исследования нуклеотидсвязывающих центров креатинкиназы из скелетных мышц кролика были использованы фотоактивные аналоги нуклеотидов: γ -(*n*-азидоанилиды) АТР [1–3] и ϵ АТР [4–6]; β -(*n*-азидоанилид) ϵ АДФ [6] и 2',3'-диальдегидные производные АТР и АДФ [7], полученные окислением соответствующих нуклеотидов периодатом натрия. Известно **, что 5α -АТР инактивирует креатинкиназу, причем в присутствии АТР наблюдается замедление инактивации фермента. Эти данные необходимы, но недостаточны для установления аффинности процесса модификации фермента аналогом субстрата. В связи с этим в данной работе исследована зависимость скорости модификации киназы от концентрации 5α -АТР и стехиометрия ковалентного присоединения аналога АТР к ферменту. Сделана попытка установить аминокислотный остаток, модифицируемый 5α -АТР в активном центре креатинкиназы.

Исследование инактивации киназы 5α -АТР при различных температурах реакционной смеси свидетельствует (рис. 1), что скорость инактивации значительно увеличивается при температурах выше 30°С. Энергия

Сокращения: 5α -АТР — γ -(N-(2-хлорэтил)-N-метил)амид АТР; Нерес — 2-N-гидроксиэтилпиперазин-N'-2-этансульфонокислота.

** Данные М. А. Грачева и сотр. (НИОХ СО АН СССР). Работа будет опубликована позже.

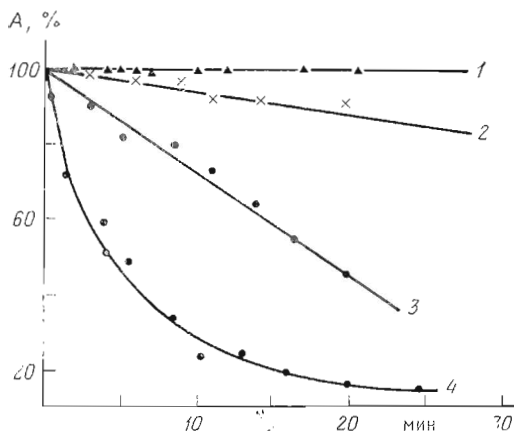


Рис. 1

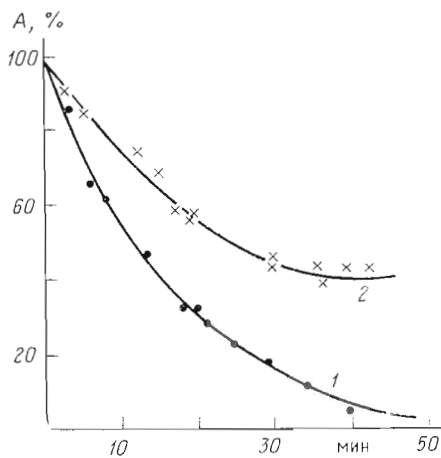


Рис. 2

Рис. 1. Зависимость активности креатинкиназы (по обратной реакции, pH 7,5 — см. «Экспер. часть») от времени инкубации с Ста-АТР в отсутствие Mg^{2+} при 15 (1), 20,4 (2), 30,3 (3) и 38° С (4). Условия инкубации: [E] 0,5 мг/мл, 0,05 М Перс/NaOH-буфер, pH 8,5

Рис. 2. Зависимость активности креатинкиназы при 30° С от времени инкубации с Ста-АТР (1,9 мМ) в отсутствие (1) и в присутствии (2) ацетата магния (5,7 мМ). Условия — см. рис. 1

активации реакции модификации фермента была оценена равной 39 ± 3 ккал/моль. Уже при 15° С не наблюдается заметной инактивации фермента даже в течение 2–3 ч. Это позволило нам останавливать реакцию модификации киназы Ста-АТР быстрым охлаждением реакционной смеси до 0° С. Эксперименты по модификации фермента аналогом АТР, описанные ниже, проведены при 30° С, поскольку, согласно работе [7], продолжительная (более 1 ч) инкубация креатинкиназы при более высоких температурах вызывает частичную инактивацию фермента за счет денатурации белка.

С помощью метода флуоресцентного титрования было показано, что величина K_d комплекса киназы с γ -(N-2-(оксиэтил)-N-метил)-амид АТР, равная 0,28 мМ, увеличивается в 3 раза (до 0,95 мМ) при добавлении ионов магния (5 мМ) [8]. Скорость инактивации фермента под действием Ста-АТР, как видно из рис. 2, также зависит от присутствия в инкубационной смеси ионов магния. Добавление ацетата магния замедляет процесс модификации киназы.

Были получены кинетические кривые инактивации креатинкиназы (pH реакционной смеси 8,5) при различных концентрациях Ста-АТР в присутствии и в отсутствие ионов магния (рис. 3). Зависимости логарифма остаточной активности фермента от времени его инкубации с Ста-АТР при различных концентрациях реагента в обоих случаях были линейными. Это указывало на псевдопервый порядок реакции модификации киназы аналогом АТР как в присутствии ионов Mg^{2+} , так и без них. Такие данные были использованы для оценки кажущихся констант скоростей инактивации ($k_{\text{наи}}$) фермента при фиксированных концентрациях Ста-АТР. На рис. 4 приведены зависимости величин $k_{\text{наи}}$ от концентрации Ста-АТР (в обратных координатах) в присутствии и в отсутствие в инкубационной смеси ацетата магния. С помощью этих зависимостей были оценены величины K_d комплексов креатинкиназы с Ста-АТР в отсутствие и в присутствии ионов Mg^{2+} (1,0 и 1,5 мМ соответственно), а также соответствующие константы максимальных скоростей инактивации фермента Ста-АТР ($2,1 \cdot 10^{-3}$ и $1,2 \cdot 10^{-3}$ с⁻¹).

Было вычислено (см. «Экспериментальную часть»), что полной инактивации фермента с помощью Ста-АТР соответствует ковалентное присоединение 1,7–1,8 моль аналога на 1 моль фермента, т. е. ковалентному блокированию подвергаются оба активных центра функционального ди-

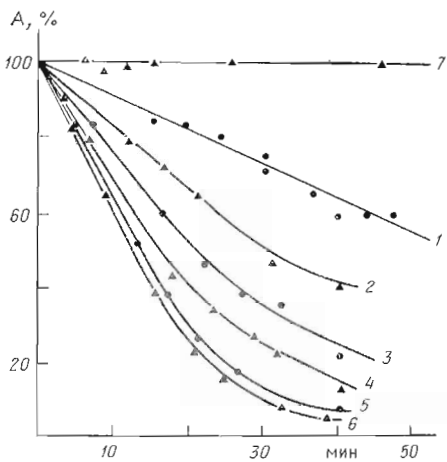


Рис. 3

Рис. 3. Зависимость активности креатинкиназы от времени инкубации при 30° С в отсутствие Mg^{2+} с Сма-АТР при его концентрациях 0,1 (1), 0,26 (2), 0,37 (3), 0,54 (4), 0,79 (5), 1,1 мМ (6); 7 — инкубация без Сма-АТР. Условия — см. рис. 1, [E] 2 мкг/мл

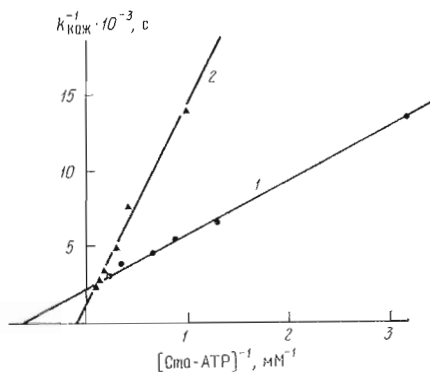


Рис. 4

Рис. 4. Зависимость величин $k_{наж}^{-1}$ при 30° С от концентрации Сма-АТР (в обратных координатах) в присутствии (1) и в отсутствие (2) ацетата магния, добавленного в трехкратном избытке по отношению к концентрации Сма-АТР. Условия — см. рис. 1

мера. Исследование защитного действия субстратов АТР и АДР на процесс инактивации фермента Сма-АТР выявило ряд особенностей. Как видно из рис. 5а, добавление АДР (5 мМ) в реакцию смесь в отсутствие ионов магния приводит только к частичной защите фермента от инактивации. Защитный эффект АДР (5 мМ) был полным, когда в реакцию смесь добавляли ацетат магния (рис. 5а). Второй нуклеотидный субстрат полностью защищал креатинкиназу от инактивации с помощью Сма-АТР даже в отсутствие ионов Mg^{2+} (рис. 5б). $Mg^{2+} \cdot АДР$ полностью защищает фермент не только от инактивации, но и от ковалентного присоединения Сма-АТР к белку.

Величины K_d комплексов АДР и $Mg^{2+} \cdot АДР$ с креатинкиназой практически не различаются (0,11 и 0,09 мМ [8]). Однако «время жизни» комплекса фермента с $Mg^{2+} \cdot АДР$ примерно в 30 раз больше, чем для комплекса АДР (константы скорости диссоциации комплексов соответственно равны $5,1 \cdot 10^3$ и $1,8 \cdot 10^4$ с $^{-1}$ [9]). По-видимому, это основная причина увеличения защитного эффекта магниевой соли АДР по сравнению со свободной АДР при их концентрациях, близких к насыщающим.

Таким образом, Сма-АТР является аффинным модификатором креатинкиназы. Процесс модификации фермента аналогом АТР полностью удовлетворяет всем основным критериям аффинности модификации биополимеров, описанным, например, в книге [10]. Модификация креатинкиназы сопровождается потерей ферментом свойственной ему активности. Начальная скорость модификации фермента изменяется в зависимости от начальной концентрации реагента по гиперболическому закону, достигая предельного значения при достаточно высоких концентрациях реагента. Средство реагента к ферменту, определенное из зависимости скорости модификации от начальной концентрации реагента, можно сравнить со средством химически неактивной формы реагента γ -(N-(2-оксиэтил)-N-метил)амида АТР, оцененным с помощью метода флуоресцентного титрования. Природные нуклеотидные субстраты АТР и АДР эффективно защищают киназу от модификации Сма-АТР. Стехиометрия ковалентного присоединения реагента к ферменту соответствует числу центров связывания киназой нуклеотидов.

В ряде случаев интерпретация данных по модификации ферментов химически активными аналогами субстратов затруднена. Так, наряду с аффинной модификацией активных центров ферментов возможно ковалент-

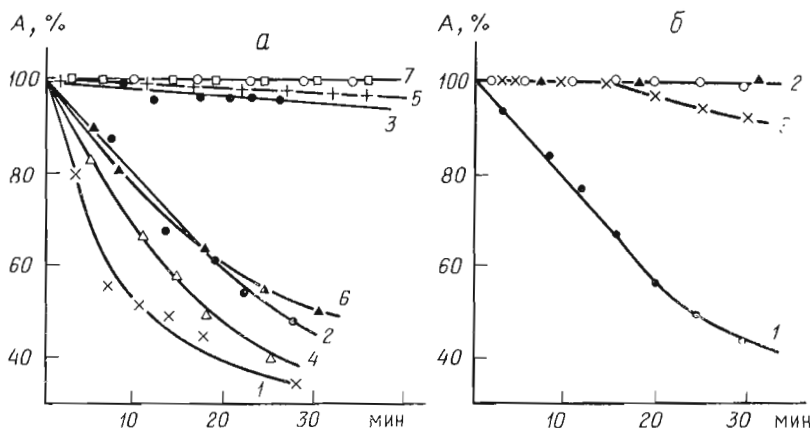


Рис. 5. Влияние ADP (а), АТФ и креатина (б) на инактивацию креатинкиназы под действием Сма-АТФ при 30°С. а — [Сма-АТФ], [ADP], [Mg²⁺], мМ: 1 — 0,65; 0; 0; 2 — 0,65; 5; 0; 3 — 0; 5; 0; 4 — 1,5; 0; 4,5; 5 — 1,5; 5; 19,5; 6 — 0,77; 0; 2,3; 7 (кружки) — 0,77; 5; 17,3; 7 (квадраты) — 0; 5; 15. Активность фермента определяли с помощью обратной реакции, рН 7,5. Условия — см. рис. 1. б — [Сма-АТФ], [АТФ], [креатин], мМ: 1 — 0,35; 0; 0; 2 (кружки) — 0,35; 3,5; 2 (треугольники) — 0; 3,5; 0; 3 — 0,35; 0; 5. Активность фермента определяли с помощью прямой реакции, рН 8,5. Условия — см. «Экспер. часть»

ное присоединение реагента вне специфических центров связывания лиганда. Добавление конкурентного к аналогу субстрата может приводить к увеличению такой модификации белка или модификации субстратсвязывающих участков другой природы, например эффекторных центров [10]. Отсутствие подобных аномалий при модификации креатинкиназы Сма-АТФ позволило нам сделать попытку более детально исследовать химический механизм модификации фермента аналогом АТФ и локализацию аминокислотного остатка, модифицируемого Сма-АТФ в активном центре фермента.

Ранее [4, 2] было показано, что креатинкиназа из скелетных мышц кролика состоит из неидентичных субъединиц, катализирующих прямую и обратную реакции в разных диапазонах рН. Однако причина такого различия в поведении субъединиц оставалась неясной. Не исключено, что в связывании или каталитическом превращении субстратов в активных центрах неидентичных субъединиц участвуют остатки различных аминокислот. Это предположение можно проверить, локализуя структурные элементы неидентичных субъединиц с помощью различных химических активных аналогов субстратов. С помощью аффинных реагентов, полученных окислением остатков рибозы в молекулах АТФ и ADP, в активных центрах как М-, так и М'-субъединиц была локализована ε-аминогруппа остатка лизина [7]. Из стехиометрии ковалентного связывания Сма-АТФ следует, что этот аналог АТФ также модифицирует обе субъединицы киназы. Для определения вероятной разницы в модификации Сма-АТФ М- и М'-субъединиц мы воспользовались возможностью следить за их активностью при рН реакционных смесей 8,5 и 5,0 соответственно, согласно работам [1, 2].

Из рис. 6 видно, что скорости инактивации М- и М'-субъединиц аналогом АТФ (он был взят в достаточно высокой концентрации (5 мМ), поскольку рН может влиять на величину K_d комплекса фермента с Сма-АТФ), зависят от рН раствора и различаются. В то же время рК модифицируемых аналогом АТФ групп в активных центрах М- и М'-субъединиц совпадают и равны 7,7.

По данным метода химической модификации, в активный центр креатинкиназы входят остатки лизина, аргинина, тирозина и гистидина [11]. ε-Аминогруппа остатка лизина локализована вблизи участка связывания рибозы молекулы АТФ [7]. Обычный диапазон значений рК гидроксильной группы тирозина и гуанидиновой группировки аргинина в белках равен 9–12 [9], а имидазольного кольца гистидина — 5–8 [9]. Вели-

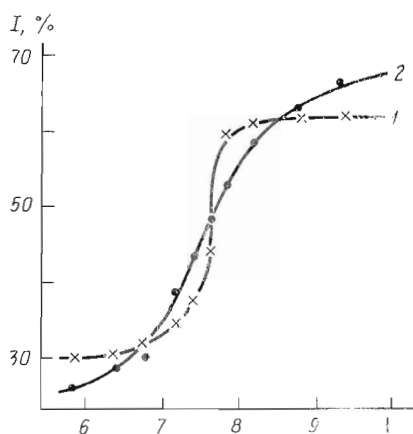


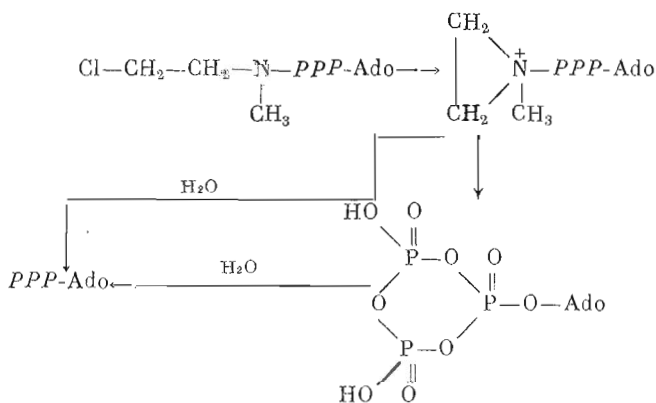
Рис. 6. Зависимости глубины инактивации (I , %) при 30°C отдельных М- (1) и М'- (2) субъединиц креатинкиназы за 10 мин инкубации фермента с Сма-АТР (5 мМ) от рН инкубационной смеси. Активность М- и М'-субъединиц киназы тестировали с помощью обратной реакции при рН реакционных смесей 8,5 и 5,0 соответственно. За 100% активности принимали начальную активность М- и М'-субъединиц при указанных рН. Расчет глубины инактивации субъединиц — см. «Экспер. часть»

чипа рК 7,7, полученная нами, наиболее вероятна для имидазола остатка гистидина.

В активных центрах креатинкиназы из скелетных мышц кролика (или вблизи них) расположены три остатка гистидина [12]. По данным исследования методом ЯМР зависимости химических сдвигов С-2-протонов этих гистидинов от рН среды [12], величины их рК составляют 7,0; 7,1 и 5,9. Значение рК одного из остатков гистидина (7,0) при насыщении фермента АТР увеличивается до 7,6—7,7. Значение рК нуклеофильной группы киназы, модифицируемой Сма-АТР, равно 7,7, практически совпадает с величиной рК гистидина (7,6—7,7) в присутствии нуклеотида. Этот остаток гистидина, согласно работам [12, 13], возможно, выполняет роль общего кислотно-основного катализатора, депротонирующего гуанидиниевую группу креатина при фосфорилировании последнего $\text{Mg}^{2+}\cdot\text{АТР}$, и локализован в участке связывания креатина.

Как видно из рис. 5б, креатин эффективно защищает киназу от инактивации с помощью Сма-АТР. Это может свидетельствовать в пользу расположения модифицируемой в активном центре киназы нуклеофильной группы в участке связывания креатина. В работах [5, 6] показано, что креатин и креатинфосфат не влияют ни на уровень ковалентного присоединения, ни на глубину инактивации креатинкиназы при модификации фермента фотоактивными аналогами АТР и $\epsilon\text{АТР}$, когда химически активная группа, присоединенная по γ -фосфатам этих нуклеотидов, не взаимодействует с участком связывания гуанидиниевых субстратов. На основании совпадения величин рК гистидина и модифицируемой Сма-АТР в киназе группы, а также проявления защитного эффекта креатина разумно предположить, что модификации в ферменте подвергается именно тот остаток гистидина, который служит акцептором протона при фосфорилировании креатина.

Как следует из работы М. А. Грачева и сотр. (см. выше), Сма-АТР в растворе может подвергаться превращениям по схеме



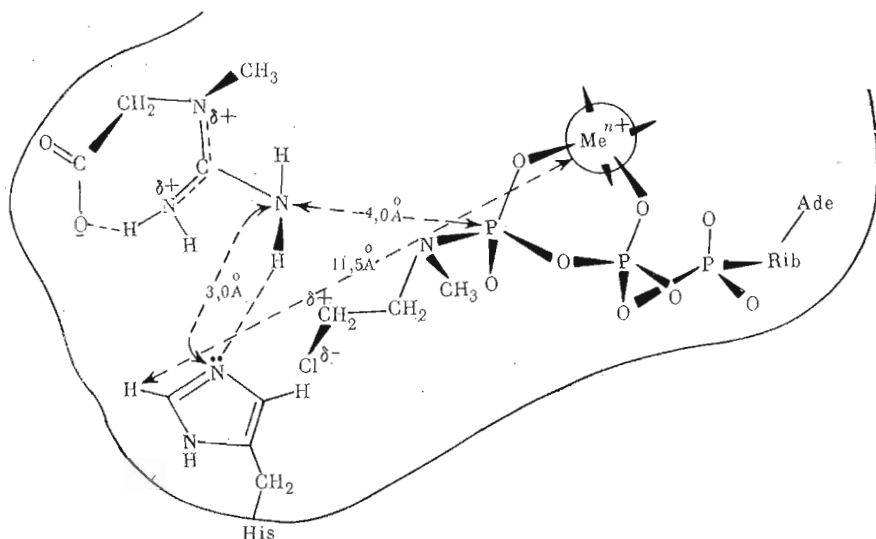


Рис. 7. Гипотетическая модель комплекса креатинкиназы с Mg^{2+} -Сма-АТР. Расстояние $11,5 \pm 0,5$ Å между $C2$ -протоном гистидина взято из работы [12], $4,0 \pm 0,5$ Å между атомом азота гуанидина и атомом фосфора γ -фосфата АТР — из работы [13], $3,0 \pm 0,5$ Å $N-H \dots N$ — из работы [12]

В ходе гидролиза Сма-АТР кинетика накопления ионов хлора совпадает с кинетикой накопления протонов и образования АТР. Константы скоростей этих процессов равны $2,4 \cdot 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ при 30°C в отсутствие ионов Mg^{2+} (рН 7,0–9,0). При добавлении в раствор Сма-АТР тиосоединений наблюдается их алкилирование. Соотношение продуктов фосфорилирования и алкилирования первичных аминов в условиях депротонирования аминогруппы (рН 10 и выше) зависит от концентрации аминов в реакционной смеси, но при больших концентрациях аминов (0,2–1,0 М) преобладает реакция алкилирования.

Очевидно, что при использовании Сма-АТР в качестве реагента для модификации ферментов структура продукта реакции модификации будет зависеть от расположения нуклеофильных групп относительно γ -фосфата, этилениммониевого катиона (см. продукт циклизации на схеме превращения Сма-АТР) и хлорэтильной группировки аналога АТР. Как установлено М. А. Грачевым и соотр.*, Сма-АТР является аффинным реагентом ДНК-зависимой РНК-полимеразы из *E. coli*, причем в этом случае наблюдается фосфорилирование остатка гистидина в активном центре фермента.

Фосфорилирование креатинкиназы Сма-АТР скорее всего не происходит: 1) инкубация модифицированной аналогом киназы при 30°C в течение 3 ч при рН реакционной смеси 6,0 не приводит к какому-либо восстановлению активности фермента, хотя в этих условиях, согласно работе [14], должен наблюдаться заметный гидролиз фосфамидной связи между γ -фосфатом АТР и азотом имидазола; 2) как следует из гипотетической модели строения активного центра креатинкиназы, построенной на базе работ Милдвана и др. [12, 13] по изучению ядерной релаксации (рис. 7), расстояние между γ -фосфатом Сма-АТР и имидазолом с рК 7,7 можно оценить равным 4–5 Å, что практически исключает возможность реакции фосфорилирования этого остатка с образованием фосфамидной связи.

Из-за большого расстояния между остатком имидазола и молекулой АТР в активном центре киназы маловероятна также и реакция алкилирования этого остатка через образование этилениммониевого катиона в молекуле Сма-АТР. Размер $N-CH_2-CH_2$ -фрагмента Сма-АТР можно оценить равным 2,5–3 Å. В связи с этим разумно предположить, что реакция

* Данные будут опубликованы позже.

ковалентного присоединения протекает по S_{N2} -механизму при непосредственной атаке атомом азота остатка гистидина частичного положительного заряда на атоме углерода, связанном с атомом хлора ($-^{\sigma+}CH_2-Cl$). Об этом свидетельствует величина максимальной скорости модификации фермента Сма-АТР ($2,1 \cdot 10^{-3} \text{ с}^{-1}$), которая на порядок больше величины константы скорости образования этилениммониевого катиона в молекуле Сма-АТР ($2,4 \cdot 10^{-4} \text{ с}^{-1}$). Высокая скорость модификации фермента по S_{N2} -механизму без предварительного образования этилениммониевого катиона может быть обусловлена высокой эффективной концентрацией нуклеофила вблизи химически активной группы аналога АТР, возникающей после образования комплекса Сма-АТР с киназой. Как следует из работы [9], эффективная концентрация при образовании прочного комплекса лиганда с ферментом может превышать реальную концентрацию лиганда на 3–6 порядков. О прямом алкилировании остатка гистидина с помощью Сма-АТР по S_{N2} -механизму говорит также высокая энергия активации реакции модификации фермента (39 ккал/моль), в то время как энергия активации образования этилениммониевого катиона несколько меньше (~ 30 ккал/моль).

Таким образом, нельзя полностью исключить, что реакция алкилирования гистидина протекает через образование промежуточного этилениммониевого катиона, но более вероятно прямое алкилирование имидазола по S_{N2} -механизму.

Особый интерес представляет вопрос о причине замедления реакции модификации фермента Сма-АТР в присутствии ионов магния. Следует полагать, что в комплексе фермента с Mg^{2+} -Сма-АТР трифосфатная группа молекулы реагента посредством иона магния фиксирована в активном центре киназы в определенной конформации и обладает пониженной подвижностью по сравнению с трифосфатной группой свободной молекулы Сма-АТР в комплексе белка с аналогом. Замедление реакции может быть следствием как изменения ориентации хлорэтильной группы относительно остатка имидазола, так и уменьшения подвижности этой группы при образовании связи между ферментом и ионом магния Mg^{2+} -Сма-АТР.

Таким образом, достигнута аффинная модификация креатинкиназы из скелетных мышц кролика с помощью алкилирующего аналога АТР. При модификации фермента аналогом не наблюдается заметного уровня ковалентного присоединения реагента вне активных центров фермента. В неидентичных М- и М'-субъединицах фермента модификации подвергаются остатки аминокислот с одинаковой величиной pK (7,7). На основании совокупности полученных данных сделано предположение, что в активных центрах креатинкиназы имеет место прямое алкилирование имидазольного кольца остатков гистидина по S_{N2} -механизму без предварительного образования в молекуле Сма-АТР промежуточного этилениммониевого катиона. Следует полагать, что Сма-АТР является перспективным аффинным реагентом для сравнения структурных элементов М- и М'-субъединиц креатинкиназы на уровне модифицируемого аналога АТР пептидов.

Экспериментальная часть

В работе использовали 90%-ный, по данным электрофореза в полиакриламидном геле, препарат креатинкиназы из скелетных мышц кролика, полученный по методу Кьюби в модификации Четвериковой (с сотр. [15]). Удельная активность фермента 200 экв. Н⁺ (мг·мин). N-(2-хлорэтил), γ -N-метиламид АТР были любезно предоставлены А. А. Мустаевым (ИОХ СО АН СССР, Новосибирск), а также получен согласно методу М. А. Грачева и сотр. (см. выше). В работе использовали АТР, АДФ, креатин и креатинфосфат (Reanal, ВНР), Непес (Ferak, ФРГ), сефадекс G-100, грубий (Pharmacia, Швеция).

Активность креатинкиназы в обратной реакции измеряли с помощью колориметрического метода по образованию креатина в соответствии с работой [2]. Реакционная смесь объемом 0,15–0,2 мл содержала 5 мМ АДФ,

10 мМ креатинфосфат, 10 мМ ацетат магния, 0,1–0,3 мкг/мл креатинкиназы, 0,1 М трис-ацетатный буфер, рН 7,5. В случае исследования зависимости скорости модификации отдельных М- и М'-субъединиц активность первой субъединицы определяли в 0,05 М Нерес/NaOH-буфере, рН 8,5, а второй — в 0,1 М натрий-ацетатном буфере, рН 5,0. Остальные компоненты реакционной смеси были как при определении активности полного фермента. Реакционную смесь инкубировали 1 мин при 30° С, реакцию останавливали, добавляя 0,2 мл щелочной смеси, содержащей 1% α -нафтола [1], затем 0,1 мл 2,5% раствора диацетила, разбавляли 2–5 мл воды. Количество образовавшегося креатина измеряли колориметрически при 520 нм.

Активность киназы в прямой реакции определяли потенциометрически [16] согласно работе [2]. Измерения вели в термостатированной кювете при 30° С и непрерывном перемешивании. Реакционная смесь объемом 1,5 мл содержала 40 мМ креатин, 4 мМ АТР, 10 мМ ацетат магния, 1 мМ дитиотреит, 0,1 мМ этилендиаминтетрауксусную кислоту, 0,1 М ацетат натрия. Реакцию начинали добавлением 0,3–1,0 мкг фермента. О начальной скорости судили по расходу 0,01 н. NaOH за первые 3 мин.

Модификацию креатинкиназы Ста-АТР проводили при 30° С в смеси объемом 0,2–0,3 мл, которая содержала 0,5–0,6 мг/мл киназы, 0,05 М буфер, 0,01–5 мМ Ста-АТР. При исследовании влияния АТР и АДФ на скорость модификации эти нуклеотиды добавляли в концентрации 3–5 мМ. В экспериментах по влиянию на модификацию фермента ионов магния в реакционную смесь добавляли ацетат магния в концентрации, в 3 раза превышающей общую концентрацию нуклеотидов. При исследовании защитного эффекта креатина его добавляли в концентрации 5 мМ. Реакцию модификации фермента осуществляли в буферных растворах: рН 6,0–6,6 натрий-ацетатный буфер; рН 7,2–10 Нерес/NaOH-буфер. Величину рН растворов для модификации измеряли непосредственно для используемой концентрации буфера (0,05 М) с помощью рН-метра рН-262 с разверткой 1 единица рН на всю шкалу при 30° С. В процессе модификации из реакционных смесей отбирали аликвоты (1–10 мкл), которые использовали для определения активности фермента в прямой и обратной реакциях.

Для сравнения скорости модификации М- и М'-субъединиц киназы фермент (0,5 мг/мл) инкубировали с Ста-АТР (5 мМ) при различных рН (6–10), из инкубационных смесей через каждые 3–5 мин (всего 10–15 проб) отбирали аликвоты (20–30 мкл), которые быстро охлаждали до 0° С. Из них отбирали аликвоты (1–5 мкл) для определения активности М- и М'-субъединиц белка при рН реакционных смесей 8,5 и 5,0 соответственно. Исходную активность субъединиц (0 мин инкубации) принимали за 100%. Для каждого фиксированного значения рН и каждой из субъединиц (М- и М'-) строили зависимость логарифма остаточной активности от времени инкубации фермента с аналогом, с помощью этих зависимостей находили усредненную величину глубины инактивации (%) М- и М'-субъединиц за 10 мин инкубации с Ста-АТР. Затем строили зависимость глубины инактивации отдельных субъединиц за 10 мин инкубации с аналогом АТР от рН инкубационной смеси.

Стехиометрию ковалентного присоединения Ста-АТР к киназе определяли следующим образом: в реакционную смесь объемом 2,1 мл, охлажденную до 0° С и содержащую 1 мг/мл белка, 0,05 М Нерес/NaOH-буфер, рН 9,0, добавляли Ста-АТР в концентрации 0,5–5 мМ. Аликвоту (1 мл) реакционной смеси (контрольная проба) подвергали гель-фильтрации при 4° С на колонке с сефадексом G-100 (15 мл) сразу после приготовления реакционной смеси. Другую часть (1 мл) реакционной смеси после ее инкубации при 30° С в течение 1–3 ч и достижения практически полной инактивации белка также подвергали гель-фильтрации. Колонка была уравновешена 0,05 М Нерес/NaOH-буфером, рН 9,0, содержащим 0,5 М KCl. Стехиометрию ковалентного связывания аналога АТР с белком рассчитывали по разнице поглощения при 260 нм 1 мг белка (2 мл) контрольной пробы и пробы после ее инкубации с Ста-АТР в условиях модификации. Защитный эффект АДФ проверяли аналогичным сравнением

проб опыта и контроля. В экспериментах в пробы, содержащие и не содержащие ADP (5 мМ), добавляли ацетат магния в концентрации, в 3 раза превышающей суммарную концентрацию нуклеотидов.

Зависимость логарифма остаточной активности киназы при инкубации с Сма-АТР от обратной величины температуры ($1/T$) имела линейный характер. Величина энергии активации (E_a) была рассчитана как среднее трех величин E_a , найденных с помощью уравнения Аррениуса:

$$\ln \frac{v_{T_2}}{v_{T_1}} = \frac{E_a (T_2 - T_1)}{RT_1 T_2},$$

где v_1 и v_2 — начальные скорости инактивации фермента аналогом АТР при температурах T_1 и T_2 ; R — газовая постоянная.

Величины $k_{\text{инак}}$ инактивации киназы при фиксированных концентрациях Сма-АТР, а также величины максимальных скоростей инактивации фермента найдены по методу Китса — Вилсона согласно [17].

Восстановление активности фермента после его модификации Сма-АТР исследовали инкубацией инактивированной более чем на 99% киназы (0,5 мг/мл) в 0,1 М натрий-ацетатном буфере, рН 6,0, при 30°С в течение 1–5 ч. Аликвоты раствора фермента, содержащие 10–15 мкг белка, отбирали через каждые 30 мин и добавляли в смесь для определения активности киназы с помощью обратной реакции (см. выше). Восстановления активности фермента не наблюдалось.

ЛИТЕРАТУРА

1. Nevinsky G. A., Ankilova V. N., Lavrik O. I., Mkrtchyan Z. S., Nersesova L. S., Akopyan J. I. FEBS Lett., 1982, v. 149, p. 36–40.
2. Невинский Г. А., Анкилова В. Н., Лаврик О. И., Мкртчян З. С., Нерсесова Л. С., Аюпян Ж. И. Биохимия, 1983, т. 48, вып. 2, с. 339–349.
3. Аюпян Ж. И., Газарянц М. Г., Мкртчян З. С., Нерсесова Л. С., Лаврик О. И., Попов Р. А. Биохимия, 1981, т. 46, вып. 2, с. 262–269.
4. Невинский Г. А., Денисов А. Ю. Биоорг. химия, 1981, т. 7, № 11, с. 1693–1700.
5. Денисов А. Ю., Невинский Г. А., Лаврик О. И. Биохимия, 1982, т. 47, вып. 2, с. 184–190.
6. Денисов А. Ю., Невинский Г. А., Лаврик О. И. Биоорг. химия, 1982, т. 8, № 1, с. 72–79.
7. Невинский Г. А., Газарянц М. Г., Мкртчян З. С. Биоорг. химия, 1983, т. 9, № 4, с. 487–495.
8. Бунева В. Н., Горикова И. И., Лаврик О. И., Мустаев А. А., Попов Р. А. Молекулярн. биология, 1980, т. 14, № 6, с. 1308–1312.
9. Фершт Э. Структура и механизм действия ферментов. М.: Мир, 1980, с. 37, 160, 167.
10. Аффинная модификация биополимеров/Ред. Кнорре Д. Г. Новосибирск: Наука, 1983, с. 56–81, 86–109.
11. Bickerstaff G. F., Price N. C. Int. J. Biochem., 1978, v. 9, p. 1–8.
12. Rosevear P. R., Desmeules P., Kenyon G. L., Mildvan A. S. Biochemistry, 1981, v. 20, № 21, p. 6155–6164.
13. Mildvan A. S. Philos. Trans. R. Soc., London, Ser. B, 1981, v. 283, p. 65.
14. Grachev M. A., Mustaev A. A. FEBS Lett., 1982, v. 137, № 1, p. 89–94.
15. Четверикова Е. П., Гринская А. В., Розанова Н. А., Рыбина В. В., Алиевская Н. В. Биохимия, 1970, т. 35, № 5, с. 953–961.
16. Milner-White E. J., Watt D. S. Biochem. J., 1971, v. 122, № 5, p. 727–740.
17. Kitz R., Wilson J. B. J. Biol. Chem., 1962, v. 237, № 10, p. 3245–3249.

Поступила в редакцию
30.VIII.1983
После доработки
30.XI.1983

AFFINITY MODIFICATION OF CREATINE KINASE FROM RABBIT SKELETAL MUSCLE BY ATP γ -AMIDE, A DERIVATIVE OF NITROGENOUS MUSTARD

NEVINSKY G. A., GAZARYANTS M. G.,* LAVRIK O. I.

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

A study of creatine kinase modification by ATP γ -(N-(2-chloroethyl)-N-methyl)amide was performed. The attachment 1,7–1,8 moles of analogue per mole of functional dimer results in full inactivation of the enzyme. The substrates, ATP and ADP, protect the enzyme both against inactivation and covalent binding of analogue. The affinity modification rate depends on the reagent and magnesium ion concentrations and pH of the reaction mixture. The dissociation constants (1,0 and 1,5 mM) for the enzyme-analogue complexes and the affinity modification maximal rate constants ($2,1 \cdot 10^{-3}$ and $1,2 \cdot 10^{-3} \text{ c}^{-1}$) in the absence and presence of Mg^{2+} ions were estimated.

Some differences in the affinity modification rates were observed for the nonidentical M and M'-subunits of creatine kinase. The data obtained are indicative of a histidine residue alkylation by the ATP analogue. This histidine (pK 7,7) may function as a general acid-base catalyst in deprotonation of the guanidinium group of creatine as the latter is phosphorylated by ATP.