



УДК 577.159.02

**ВЫЯВЛЕНИЕ НУКЛЕОТИДСВЯЗЫВАЮЩИХ УЧАСТКОВ
ДВУХ ТИПОВ В ТРИПТОФАНИЛ-ТРНК-СИНТЕТАЗЕ
И ИХ МОДИФИКАЦИЯ****Невинский Г. А., Лаврик О. И.***Институт органической химии СО Академии наук СССР, Новосибирск***Фаворова О. О., Киселев Л. Л.***Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва*

Исследовано взаимодействие триптофанил-ТРНК-синтетазы из поджелудочной железы быка с AMP, GMP, CMP, ADP, GDP, а также с *n*-азидоанилидами ADP, GDP, ATP, GTP и CTP. Показано, что эти соединения активируют реакцию обмена ATP — [³²P]пирофосфат с максимальным эффектом увеличения скорости обмена в диапазоне концентрации 1—5 мкМ для AMP, GMP, CMP, *n*-азидоанилидов ADP, GDP и в диапазоне 10—50 мкМ для ADP, GDP, *n*-азидоанилидов ATP, GTP и CTP.

При более высоких концентрациях эти нуклеозидфосфаты и их аналоги являются ингибиторами смешанного типа по отношению к ATP в реакции обмена ATP — [³²P]пирофосфат. При фотоприсоединении γ -(*n*-азидоанилида) ATP к ферменту в присутствии ATP или GMP наблюдается защита от присоединения 2 моль аналога, причем эффект ATP и GMP аддитивен. Ковалентное присоединение γ -(*n*-азидоанилида) GDP к ферменту не зависит от добавления ATP, ингибируется в присутствии GMP и приводит к исчезновению активирующего действия нуклеозидфосфатов. Приведенные результаты свидетельствуют о наличии на ферменте наряду с центрами связывания ATP нуклеотидсвязывающих центров другого типа, предназначенных, вероятно, для взаимодействия с эффекторами.

ATP в отличие от аминокислоты и ТРНК является субстратом, общим для всех аминоацил-ТРНК-синтетаз (КФ 6.1.1). При изучении ATP-связывающих центров синтетаз выяснилось, что некоторые аналоги ATP при взаимодействии с ферментом ведут себя неконкурентно по отношению к ATP [1—7]. Такой характер ингибирования ферментативной активности позволил предположить, что у аминоацил-ТРНК-синтетаз могут быть нуклеотидсвязывающие участки, отличные от центров связывания субстрата, однако прямо это показано не было.

В данной работе исследовано взаимодействие триптофанил-ТРНК-синтетазы (ТРСазы) с моно-, ди- и трифосфатами нуклеозидов и с их амидами, содержащими фотоактивную группировку, для выявления нуклеотидсвязывающих участков фермента, отличных от каталитических.

Сокращения: ТРСаза — триптофанил-ТРНК-синтетаза; азидо-ATP — γ -(*n*-азидоанилид) ATP, аналогично для других нуклеозидтрифосфатов; азидо-ADP — β -(*n*-азидоанилид) ADP, аналогично азидо-GDP; ЦМЭ-КДИ — *n*-толуолсульфонат N-циклогексил-N- β -(4-метилморфолиний)этилкарбонимида; БСА — бычий сывороточный альбумин; ТХУ — трихлоруксусная кислота; ТЭАБ — бикарбонат триэтиламмония.

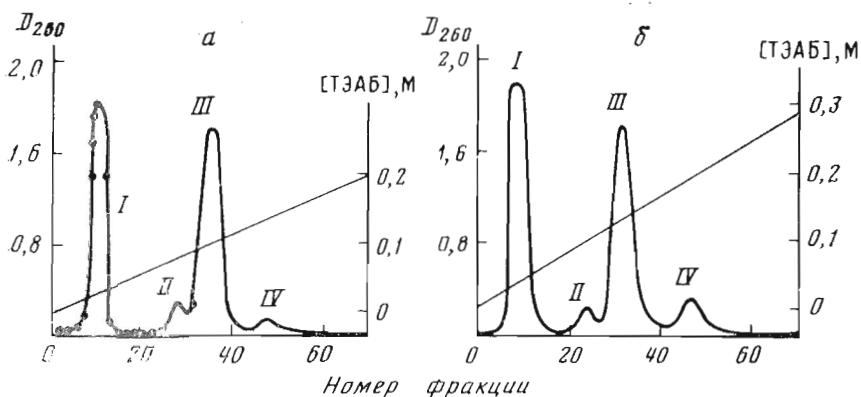


Рис. 1. Хроматографическое выделение азидо-GDP (а) и азидо-GTP (б) на DEAE-целлюлозе (HCO_3^- -форма): *n*-толуолсульфонат (I); GMP (IIа), GDP (IIб); азидо-GDP (IIIа), азидо-GTP (IIIб); GDP (IVа), GTP (IVб)

Рис. 2. Хроматографическое выделение азидо-АТР на DEAE-целлюлозе: *n*-толуолсульфонат (I), соединение нуклеотидной природы (II), ADP (III), азидо-АТР (IV), АТР (V)

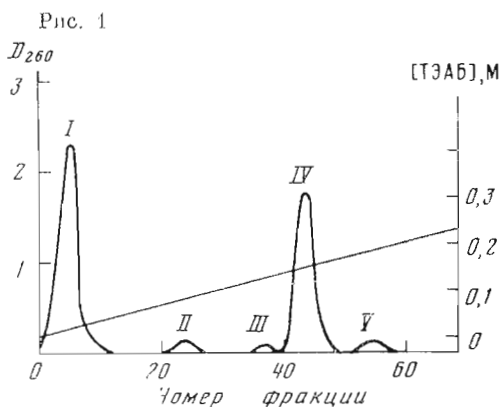
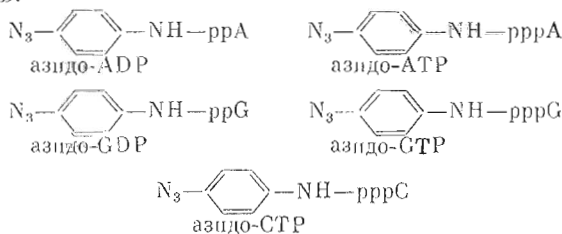


Рис. 2

Синтез фотоактивируемых производных нуклеозидфосфатов. Мы провели синтез следующих фотоактивируемых производных ди- и трифосфатов нуклеозидов:



Азидо-АТР использован нами ранее для модификации ТРСазы из поджелудочной железы быка [8] и фенилаланил-тРНК-синтетазы из *E. coli* MRE-600 [9, 10]. Однако полная характеристика азидо-АТР и синтез *n*-азидоанилидов ADP, GDP, GTP и СТР приводятся впервые.

Эти аналоги были синтезированы по разработанному ранее в нашей лаборатории методу [11], основанному на взаимодействии аминов с активированными ЦМЭ-КДИ производными ди- и трифосфатов нуклеозидов. Все соединения были выделены из реакционных смесей хроматографией на DEAE-целлюлозе в HCO_3^- -форме в линейном градиенте концентраций ТЭАБ, рН 7,5. Примеры выделения азидо-АТР, азидо-GDP и азидо-GTP приведены на рис. 1 и 2. При промывании колонки 0,01—0,02 М ТЭАБ полностью элюируется избыток непрореагировавшего *n*-азидоанилина. Пик I соответствует *n*-толуолсульфонату, пик II — нуклеозиддифосфату либо монофосфату в случае аналогов нуклеозидтрифосфатов и нуклеозиддифосфатов соответственно. Пик III соответствует продукту реакции,

Таблица 1

Химические сдвиги (м.д.) протонов азидо-АТР и исходных соединений

Соединения	Аденин		Рибоза Н-1	Ароматиче- ские протоны
	Н-8	Н-2		
АТР	8,56	8,20	6,16	
<i>n</i> -азидоанилин	—	—	—	7,48 7,30
Азидо-АТР	8,53	8,28	6,04	6,95 6,67

Таблица 2

Влияние нуклеозидфосфатов и их *n*-азидоаналогов на реакцию АТР — [³²P]пирофосфатного обмена, катализируемую ТРСазой из поджелудочной железы быка *

Аналог	Активация реакции, %	Концентрация аналога в максимуме ак- тивации, мкМ	Тип ингибирования при концентрациях выше 10 ⁻³ М	Величина K _i , мМ
АМР	15–20	2–3	Конкурентное	2
ГМР	20	2–3	Смешанное	2
СМР	20	2–3	Не определяется	—
АДР	5–10	25	Близкий к бесконку- рентному	2,5
ГДР	5–10	20–30	Смешанный	2,5
Азидо-АДР	20–30	2–3	»	3
Азидо-ГДР	20–30	2–3	»	4
Азидо-СТР	20	20–30	Не определяется	—
Азидо-СТР	20	30–40	»	—
Азидо-АТР	20–30	25–30	Конкурентный **	1

* В каждом случае проведено не менее трех параллельных экспериментов; ошибка определения скорости АТР — [³²P]пирофосфатного обмена не превышала 5%.

** Определен в реакции аминотрипировании тРНК [8].

а пик IV — исходному неперереагировавшему нуклеозидфосфату. В большинстве случаев пики II и III достаточно хорошо разделялись и продукты были гомогенными по данным хроматографии на ДЕАЕ-целлюлозе и на бумаге.

При гидролизе азидов АДР, АТР, ГДР и СТР в течение 2–3 ч в 0,1 М НСl при 40° получается *n*-азидоанилин и соответственно АДР, АТР, ГДР и СТР в соотношении 1 : 1, в молях. Продукты гидролиза идентифицированы с помощью хроматографии на бумаге и микроколоночной хроматографии на ДЕАЕ-целлюлозе в системе Томлисона — Тенера (рН 7,5). Данные ПМР-спектров (табл. 1) также соответствуют предполагаемой структуре. По интегральным спектрам найдено, что в составе азидо-АТР *n*-азидоанилин и АТР находятся в соотношении 1 : 1.

Наличие азидогруппы в этих соединениях показано с помощью ИК-спектров (полоса поглощения в области 2100–2140 см⁻¹). Структура всех пяти *n*-азидоанилинов нуклеотидов подтверждена также УФ-спектрами. На рис. 3 приведены УФ-спектры азидо-АТР и исходных соединений: *n*-азидоанилина и АТР. Видно, что азидо-АТР по сравнению с АТР имеет плечо в спектре поглощения в области 290–320 нм, характерное для *n*-азидоанилина и обусловленное присутствием азидогруппы [12]. Аналогичный вид имели УФ-спектры поглощения всех синтезированных соединений.

Нуклеотидсвязывающие участки триптофанил-тРНК-синтазы. Ранее [8] было показано, что азидо-АТР является конкурентным по отно-

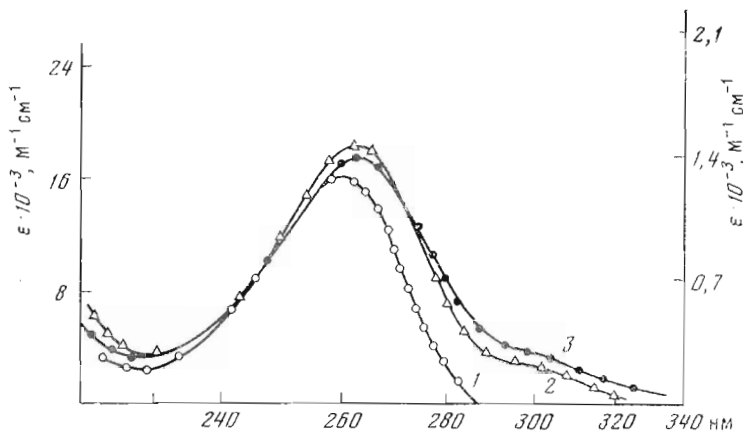


Рис. 3. УФ-спектры АТР (1), азидо-АТР (2), левая шкала, *n*-азидоанилина (3), правая шкала, при рН 6,0

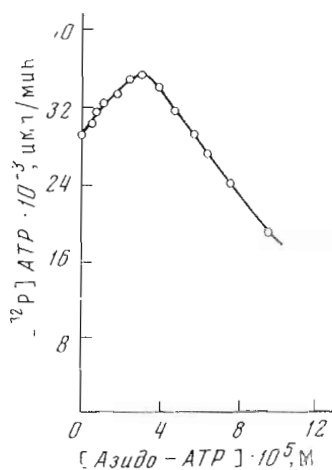


Рис. 4

Рис. 4. Зависимость уровня реакции обмена АТР — $[^{32}\text{P}]$ пирофосфат за 10 мин от концентрации азидо-АТР при 35° . Реакционная смесь содержала $2,5 \cdot 10^{-4}$ М АТР

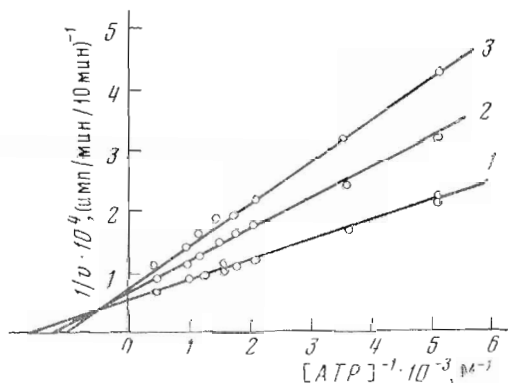


Рис. 5

Рис. 5. Зависимость скорости реакции АТР — $[^{32}\text{P}]$ пирофосфатного обмена от концентрации АТР при различных концентрациях азидо-GDP (обратные координаты): без ингибитора (1); $2 \cdot 10^{-3}$ М азидо-GDP (2); $4 \cdot 10^{-3}$ М азидо-GDP (3)

шению к АТР ингибитором реакций обмена АТР — $[^{32}\text{P}]$ пирофосфат и аминокислотированья тРНК, катализируемых ТРСазой из поджелудочной железы быка. Однако при низких концентрациях азидо-АТР активировал реакцию обмена. На рис. 4 показана зависимость скорости реакции обмена между $[^{32}\text{P}]$ пирофосфатом и АТР от концентрации азидо-АТР. Видно, что в интервале концентрации аналога от 10 до 50 мкМ наблюдается увеличение скорости реакции до 30% по сравнению с реакцией в отсутствие аналога.

Зависимость скорости реакции обмена АТР — $[^{32}\text{P}]$ пирофосфат от концентрации нуклеотидов была подробно исследована для других *n*-азидоанилидов нуклеотидов, а также для АМР, GMP, CMP, ADP и GDP. Результаты показаны в табл. 2. Видно, что все азидоанилиды являются эффективными реакциями обмена. Максимальное эффекторное действие (увеличение скорости до 30%) наблюдается для азидо-ADP, азидо-GDP и азидо-АТР. Увеличение скорости реакции в присутствии азидо-ADP

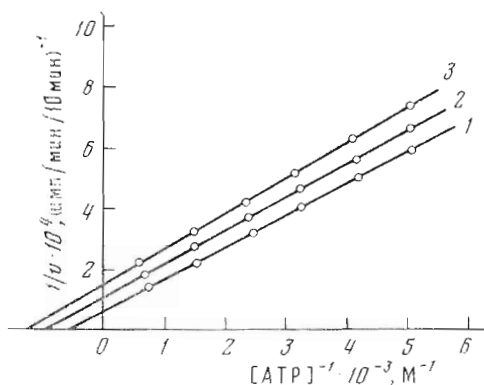


Рис. 6

Рис. 6. Зависимость скорости реакции АТР — $[^{32}\text{P}]$ пирофосфатного обмена от концентрации АТР при различных концентрациях АДФ (обратные координаты): без ингибитора (1); $1,25 \cdot 10^{-3}$ М АДФ (2); $5 \cdot 10^{-3}$ М АДФ (3)

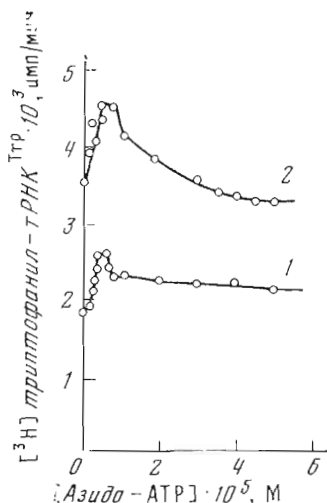


Рис. 7

Рис. 7. Зависимость скорости аминоацилирования tRNA^{Trp} от концентрации азидо-АТР при постоянной концентрации АТР ($7,5 \cdot 10^{-4}$ М). Время реакции 4 (1) и 8 мин (2)

и азидо-GDP наблюдается в диапазоне концентраций этих аналогов от 1 до 5 мкМ с максимумом при концентрации 3 мкМ. Природные нуклеозидфосфаты — более слабые эффекторы. АМР, ГМР и СМР увеличивают скорость реакции на 15—20% с максимумом при 3 мкМ. АДФ и GDP обладают слабым эффекторным действием, проявляющимся в другой области концентраций — 10—50 мкМ. В этой же области концентраций наблюдается эффекторное действие *n*-азидоанилидов АТР, ГТР и СТР.

Практически все аналоги при более высоких концентрациях (от 1 до 5 мМ) ингибируют реакцию обмена. На рис. 5 показана зависимость скорости реакции обмена от концентрации АТР в присутствии различных концентраций азидо-GDP. Видно, что наблюдается ингибирование смешанного типа. Однако при более низких концентрациях аналогов (до 1 мМ) характер ингибирования близок к бесконкурентному типу. Для АДФ ингибирование имеет бесконкурентный характер и в области высоких концентраций. Зависимость скорости реакции обмена от концентрации АТР при различных концентрациях АДФ показана на рис. 6.

Тип ингибирования и значения констант для исследованных соединений приведены в табл. 2. В большинстве случаев наблюдается ингибирование смешанного типа с близкими значениями K_i , что может свидетельствовать о низкой избирательности при связывании ферментов нуклеозидфосфатов и их производных.

Мы исследовали влияние азидо-GDP, азидо-АТР и азидо-ГТР на скорость реакции аминоацилирования tRNA . Для азидо-АТР максимум активации наблюдается при концентрации аналога, равной 5 мкМ (рис. 7). Результаты для других нуклеозидтрифосфатов показаны в табл. 3.

Полученные данные согласуются с предположением о наличии на ферменте двух типов нуклеотидсвязывающих центров. Центры одного типа — каталитические; взаимодействие с ними АТР приводит к образованию аминоациладенилата. За связывание с этими центрами нуклеозидфосфаты конкурируют с АТР. Кроме того, имеются нуклеотидсвязывающие участки второго типа, с которыми аналоги АТР взаимодействуют более эффективно, чем АТР. Связывание нуклеозидфосфатов, присут-

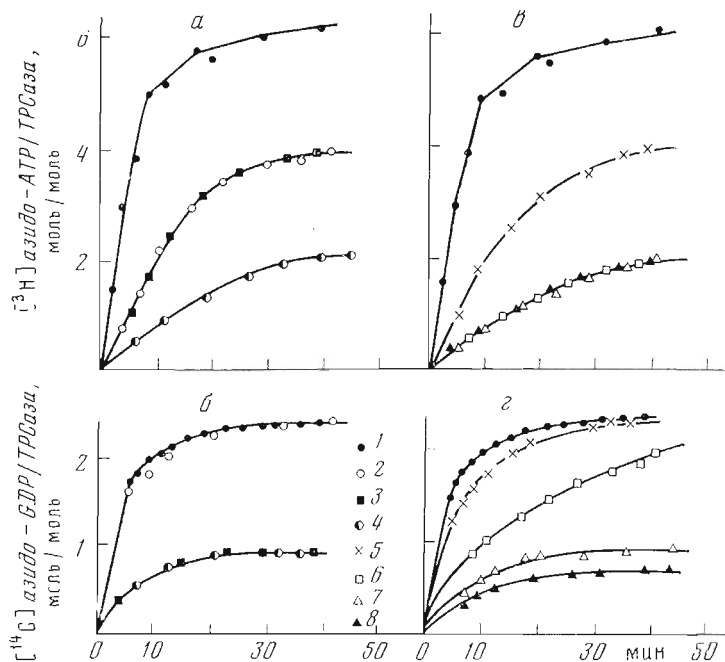


Рис. 8. Кинетика фотоиндуцируемого присоединения $[^3\text{H}]$ азидо-АТР (а, в) и $[^{14}\text{C}]$ азидо-GDP (б, г) к ТРСазе в присутствии различных лигандов: 1 — контроль (в отсутствие лигандов), 2 — АТР, 3 — GMP, 4 — АТР + GMP, 5 — Трп, 6 — Трп + АТР, 7 — Трп + GMP, 8 — Трп + АТР + GMP. Искользованные концентрации: 10^{-4} М $[^3\text{H}]$ азидо-АТР, 10^{-4} М $[^{14}\text{C}]$ азидо-GDP, 10^{-3} М GMP, 10^{-3} М триптофан, 10^{-3} М АТР, 0,05 М трис-НСl (рН 7,5), 10^{-3} М MgCl_2 и 0,2 мг/мл ТРСазы

ствующих в концентрациях на 1—2 порядка ниже величины K_m для АТР, с этими центрами приводит к увеличению скоростей реакций обмена АТР — $[^{32}\text{P}]$ пирофосфат и реакции аминокислотирования тРНК, что может указывать на эффекторную роль таких центров.

Дополнительные доказательства существования нуклеотидсвязывающих участков, отличающихся от каталитических, были получены при изучении влияния лигандов на модификацию фермента с помощью азидо-АТР и азидо-GDP. На рис. 8а показаны кинетические кривые ковалентного присоединения $[^3\text{H}]$ азидо-АТР к ТРСазе и влияние на это присоединение АТР и GMP. Как было показано ранее [8], уровень ковалентного присоединения азидо-АТР зависит от концентрации реагента и в наших экспериментальных условиях равен 6 моль на моль фермента.

АТР защищает от фотоприсоединения 2 моль азидо-АТР на моль фермента (рис. 8а). Таким же защитным действием обладает GMP. При совместном присутствии АТР и GMP наблюдается защита от присоединения 4 моль реагента. Защитный эффект нуклеотидов позволяет предполагать, что модификация фермента азидо-АТР происходит специфически, после образования нековалентного комплекса между реагентом и нуклеотидсвязывающими участками фермента. Однако помимо модификации ТРСазы по специфическим центрам имеет место и неспецифическая модификация высокоактивным нитреновым радикалом, как это показано в работе [9]. Аддитивное защитное действие АТР и GMP, приводящее к уменьшению уровня ковалентного присоединения азидо-АТР на 4 (2 + 2) моль на моль фермента, показывает, вероятно, что каждая из идентичных субъединиц фермента имеет по два нуклеотидсвязывающих центра, модифицируемых азидо-АТР. Один из них, защищаемый АТР и другими адениновыми нуклеотидами, является субстратсвязывающим, другой специфичен к GMP и выполняет иные, возможно регуляторные, функции.

Таблица 3

Влияние *m*-азидоанилидов нуклеозидфосфатов на реакцию
аминоацилирования тРНК^{GTP}, катализируемого
триптофан-тРНК-синтетазой из поджелудочной
железы быка *

Аналог	Активация реакции, %	Диапазон кон- центраций, в котором наблю- дается актива- ция, мкМ	Концентрация аналога в максимуме активации, мкМ
Азидо-АТФ	20-30	2-10	5
Азидо-GDP	20-30	0,2-1	0,6
Азидо-GTP	20-30	8-25	18

* Проведено не менее трех параллельных экспериментов, ошибка определения скорости аминоацилирования тРНК 2-3%.

Таблица 4

Влияние лигандов на уровень ковалентного присоединения
азидо-АТФ к ТРСазе *

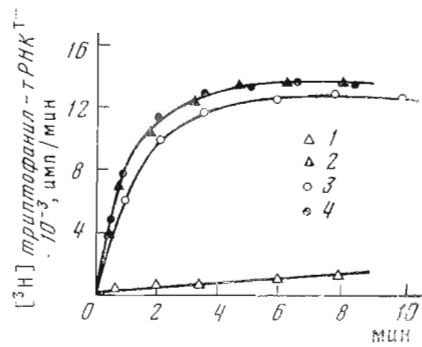
Лиганд	Концентрация лиганда, мМ	Уровень ковалентного присоеди- нения азидо-АТФ (моль аналога/моль фермента)
АТФ	1	2
GMP	1	2
GMP+АТФ	1+1	4
AMP	1-5	1,5-2
AMP+АТФ	1+1	2
ADP	1-5	1,5-2
ADP+АТФ	1+1	2

* ТРСазу (0,2 мг/мл) модифицировали [³²H]азидо-АТФ (10⁻⁴ М) в присутствии 0,05 М трис-HCl-буфера (рН 7,5), 10⁻³ М MgCl₂ и различных лигандов в указанных концентрациях. В контрольной пробе модификацию проводили в отсутствие лигандов.

Данные по влиянию лигандов на степень модификации азидо-GDP представлены на рис. 8б. Происходит ковалентное присоединение 2-3 моль азидо-GDP на моль фермента; АТФ не влияет на степень модификации, а GMP препятствует присоединению более чем 1,5 моль модификатора на моль фермента. Из сопоставления данных рис. 8а и б следует, что азидо-GDP в отличие от азидо-АТФ модифицирует только один из двух нуклеотидсвязывающих центров, а именно специфичный к GMP.

Результаты по защитному действию лигандов при модификации азидо-АТФ показаны также в табл. 4. Видно, что как AMP, так и ADP защищают фермент от ковалентного присоединения 1,5-2 моль азидо-АТФ. При этом не наблюдается аддитивного защитного эффекта этих лигандов с АТФ. Эти результаты еще раз свидетельствуют о наличии на ферменте нуклеотидсвязывающих центров двух типов и показывают, что субстратсвязывающий участок специфичен не только к АТФ, но и к другим адениновым нуклеотидам. Однако при исследовании стимулирующего действия нуклеотидов на реакцию АТФ — [³²P]пирофосфатного обмена (табл. 2) мы наблюдали активацию реакции не только GMP, но и адениновыми нуклеотидами, что позволило сделать предположение о связывании последних по второму, некаталитическому центру. Причину этого кажущегося несоответствия следует искать, по-видимому, в различных условиях постановки эксперимента. Действительно, активирующее действие адениновых нуклеотидов наблюдалось в полной инкубационной смеси, содержащей также и триптофан. Дальнейшие эксперименты по защите различными нуклеотидами от фотоприсоединения азидо-АТФ проводили в присутствии триптофана.

Рис. 9. Защитный эффект триптофана при фотоиндуцируемой инактивации ТРСазы азидо-АТР. ТРСазу (0,2 мг/мл) инкубировали с 10^{-4} М азидо-АТР в присутствии (1, 2) и в отсутствие (3, 4) 10^{-4} М Трп. 2, 4 — темновой контроль; 1, 3 — облучение в течение 40 мин. Активность фермента после инкубации с азидо-АТР определяли по кинетике реакции аминоацелирования тРНК^{Трп}



На рис. 8*в* показано влияние триптофана на модификацию ТРСазы азидо-АТР, сводящееся к защите от фотоприсоединения 2 моль азидо-АТР на моль фермента. Параллельно происходит полная защита фермента от инактивации (рис. 9). Эти результаты можно объяснить тем, что связывание триптофана создает стерические препятствия для фотоприсоединения достаточно объемной молекулы азидо-АТР при его посадке по субстратному центру. Действительно, нами было показано, что азидо-АТР является ингибитором, конкурентным как по отношению к АТР, так и по отношению к соответствующим аминокислотам в реакциях, катализируемых некоторыми ЛРСазами. В работе [9] наблюдали, что фенилаланин защищает фенилаланин-тРНК-синтетазу от инактивации подобным азидо-АТР фотоактивным аналогом АТР. Таким образом, как АТР (рис. 8*а*), так и аминокислота могут служить лигандами, защищающими синтетазы от ковалентного присоединения азидо-АТР к активному центру фермента. В таком случае следует ожидать аддитивного защитного эффекта триптофана и GMP от ковалентного присоединения азидо-АТР к ТРСазе. Действительно, GMP совместно с триптофаном защищают от присоединения 4 моль азидо-АТР на моль ТРСазы, а добавление АТР как третьего лиганда не приводит к увеличению защитного действия (рис. 8*б*). В то же время триптофан не защищает фермент от ковалентного присоединения азидо-GDP (рис. 8*г*), что может свидетельствовать об отсутствии взаимодействия триптофана с эффекторными центрами фермента. Аналогичная ситуация наблюдалась в случае АТР (рис. 8*б*). Однако, несмотря на отсутствие влияния этих лигандов порознь, при одновременном добавлении АТР и триптофана наблюдается защита от ковалентного присоединения ~0,7 моль азидо-GDP на моль фермента (рис. 8*г*). «Синергическое» действие АТР и триптофана наблюдается и во влиянии их на фотоприсоединение азидо-АТР (рис. 8*в*). В этом случае наблюдается защита от присоединения 4 моль аналога.

Эти результаты могут быть объяснены тем, что АТР, как и другие адениновые нуклеотиды, не взаимодействуют с эффекторными центрами фермента, пока в среде отсутствует триптофан. В присутствии аминокислот происходит изменение специфичности эффекторного центра и адениновые нуклеотиды, связываясь с последним, защищают его от модификации (рис. 8*в*, *г*), а также стимулируют АТР — [³²P]пирофосфатный обмен (табл. 2). γ -Амиды-АТР, однако, способны к взаимодействию с обоими центрами ТРСазы и в отсутствие триптофана. Эти данные согласуются с результатами, полученными для других АТР-узнающих ферментов. Например, в случае гексокиназы из дрожжей эффекторный центр взаимодействует с АТР только в присутствии второго субстрата — гексозы. В то же время аналоги АТР, модифицированные по трифосфатной группировке, могут взаимодействовать с эффекторным центром фермента как в отсутствие, так и в присутствии гексозы [13, 14].

На рис. 10*а* показаны кинетические кривые реакции АТР — [³²P]пирофосфатного обмена, катализируемого ТРСазой при добавлении различ-

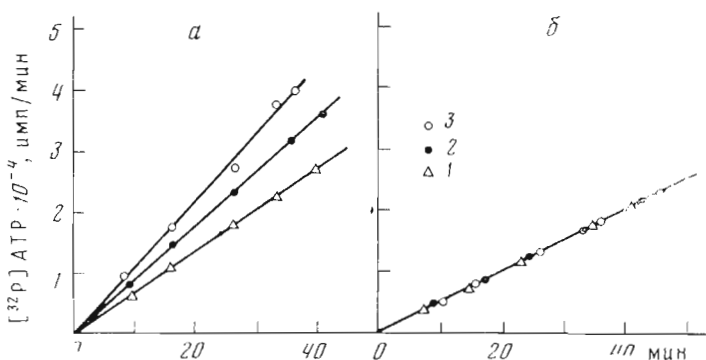


Рис. 10. Кинетика АТР— $[^{32}\text{P}]$ пирофосфатного обмена, катализируемого препаратом ТРСазы темнового контроля (а) и модифицированной азидо-GDP ТРСазой (б) в присутствии и в отсутствие активатора реакции (азидо-ADP): 1 — в отсутствие азидо-ADP, 2 — в присутствии $2 \cdot 10^{-6}$ М азидо-ADP, 3 — в присутствии $3,2 \cdot 10^{-6}$ М азидо-ADP.

ных концентраций азидо-ADP. Наблюдается активация этой реакции под действием аналога. На рис. 10б показаны те же зависимости, но для фермента, блокированного ковалентным присоединением азидо-CDP. Видно, что активирующий эффект азидо-ADP на блокированном ферменте исчезает. Эти результаты прямо показывают, что с помощью азидо-GDP удалось заблокировать центр, участвующий в активации реакции обмена.

Обнаружение нуклеотидсвязывающих центров, отличных от АТР-связывающего субстратного участка, в принципе может объясняться присоединением аналогов АТР по тРНК-связывающему участку на ферменте. Хотя эта возможность пока не исключена, против нее свидетельствует активация аналогами АТР как реакции обмена АТР — $[^{32}\text{P}]$ пирофосфат, так и реакции аминоацилирования тРНК. Кроме того, согласно нашим предварительным данным, ТРСаза, модифицированная азидо-GDP, продолжает катализировать реакцию аминоацилирования.

В данной работе удалось впервые обнаружить активирующее действие нуклеозидтрифосфатов на реакции обмена АТР — $[^{32}\text{P}]$ пирофосфат и аминоацилирования тРНК в области концентраций аналогов, на 1—2 порядка ниже величины константы Михаэлиса для АТР. Наиболее приемлемым объяснением наблюдаемых эффектов, по нашему мнению, является наличие на ферменте центров, обладающих повышенным сродством к нуклеозидфосфатам. Связывание лигандов по этим участкам приводит к увеличению скорости каталитического превращения субстратов. Характерно, что наибольшую эффективность связывания имеют аналоги, содержащие два отрицательных заряда в фосфатной части молекулы: *n*-азидоанилиды нуклеозиддифосфатов и мононуклеотиды, причем избирательность по отношению к основанию почти отсутствует.

В пользу изложенной интерпретации говорят также опыты по защите фермента от модификации азидо-АТР с помощью АТР и GMP. Сам факт защиты фермента этими нуклеотидами от фотоприсоединения 2 моль аналога можно было бы объяснить конкуренцией этих лигандов за одни и те же неспецифические центры фотоприсоединения азидо-АТР, которые, как предполагалось ранее [8], могут присутствовать на триптофанил-тРНК-синтетазе. Однако аддитивность защиты (неприсоединение 4 моль в присутствии АТР + GMP) говорит против такой возможности и соответствует ситуации, когда АТР и GMP препятствуют фотоприсоединению азидо-АТР к разным типам нуклеотидсвязывающих участков фермента.

При модификации фермента с помощью азидо-GDP вообще не наблюдалось защитного действия АТР при концентрациях, на два порядка превышающих концентрацию аналога, а эффективным протектором в этом случае был GMP. Это может свидетельствовать о предпочтительном свя-

зывании азидо-GDP по нуклеотидсвязывающим центрам, отличным от субстратных. В результате этой модификации другой нуклеотид — азидо-ADP перестает активировать реакцию обмена АТР — $[^{32}\text{P}]$ пирофосфат, что свидетельствует о наличии эффекторных центров у ТРСазы.

Экспериментальная часть

Триптофанил-тРНК-синтетаза (КФ 6.1.1.2) выделена в индивидуальном состоянии из поджелудочной железы крупного рогатого скота, как описано ранее [15]. Использовали ферментную форму E_2 , имеющую субъединичную структуру α_2 , мол. вес 120 000 и коэффициент молярной экстинкции ϵ_{280} , равный $10,7 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$. Суммарная дрожжевая тРНК получена в СКТБ БАВ Главмикробиопрома и содержала 0,4% тРНК^{Trp}. После дополнительного фракционирования [16] препарат содержал 10% тРНК^{Trp}. Препараты CMP, GDP, GTP, AMP, CTP, UTP (Reanal) были проверены на чистоту хроматографией на DEAE-целлюлозе; чистота препаратов 99—99,5%. Если указанные препараты содержали более 1% примесей, то их подвергали дополнительной очистке. АТР (Reanal) содержала не более 0,25% примеси. В работе использовали *L*-триптофан (National Biochemical Corporation), *D, L*- $[^3\text{H}]$ триптофан (6 Ки/ммоль), $[^{32}\text{P}]$ пирофосфат (12 мКи/ммоль), $[^3\text{H}]$ АТР (11,8 Ки/ммоль), $[^{14}\text{C}]$ АТР (30 мКи/ммоль, «Изотоп»), $[^{14}\text{C}]$ GDP (40 мКи/ммоль, ЧССР), сефадексы G-100 и G-50 (Pharmacia Fine Chemicals), нитроцеллюлозные фильтры AUFS (1,5 мкм) и HUFS (0,4 мкм) фирмы Chemapol (ЧССР), Нерит А (Serva).

Спектры ЯМР снимали на ЯМР-спектрометре НХ-90 с фурье-преобразователем В-NC-12 (Bruker-Physic AG, ФРГ) на частоте 80 МГц в D_2O с *трет*-бутанолом в качестве внутреннего стандарта.

УФ-спектры регистрировали на спектрофотометре UV VIS (ГДР), ИК-спектры — на спектрометре IR (ГДР).

Реакцию АТР — $[^{32}\text{P}]$ пирофосфатного обмена проводили при 25°, как описано ранее [17]. Инкубационная смесь объемом 0,2—1 мл содержала $1\text{--}5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ триптофан, $10^{-3}\text{--}10^{-2} \text{ M}$ $[^{32}\text{P}]$ пирофосфат, $10^{-3}\text{--}5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ MgCl_2 , 0,05 М трис-НСI-буфер (рН 7,5), 0,1% желатин, 1—4 мкг/мл ТРСазы, $10^{-4}\text{--}3 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ АТР и от 10^{-7} до $5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ нуклеотидов и их аналогов, где указано. Реакцию запускали добавлением ТРСазы, а останавливали добавлением пятикратного объема 5% ТХУ, содержащей 1% активированный уголь и 10^{-2} M пирофосфат. Смесь тщательно перемешивали и наносили на нитроцеллюлозные фильтры, которые промывали водой 7 раз по 7 мл. Затем на фильтр наносили 0,2 мл 2% раствора поливинилового спирта. Диски сушили и определяли их радиоактивность в толуольном сцинтиллаторе на счетчике Mark II (Nuclear Chicago, США).

Реакцию аминокислотирования дрожжевой тРНК^{Trp} (2%) проводили при 25° в оптимальных условиях [18]. Инкубационная смесь объемом 0,3—1 мл содержала $3\text{--}5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ $[^3\text{H}]$ триптофан, $5 \cdot 10^{-4}\text{--}10^{-3} \text{ M}$ АТР, $3 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ MgCl_2 , 0,1 М трис-НСI (рН 8), $3\text{--}5 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ тРНК^{Trp}, 50 мкг/мл БСА, 1—2 мкг/мл ТРСазы, 10^{-4} M EDTA и от 10^{-7} до $5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ азидо-АТР, азидо-ADP, азидо-CTP, азидо-GTP или азидо-GDP. Аликвоты по 75—100 мкл реакционной смеси наносили на мишени из ватмана 3 мм размером $3 \times 3 \text{ см}$, пропитанные 5% ТХУ, содержащей 0,5% триптофан, и промывали при 4—5° в 5% ТХУ, содержащей 30—40% этилового спирта (по объему) и 0,5% триптофан в пяти растворах последовательно. Мишени выдерживали в каждом растворе в течение 7 мин, затем сушили на воздухе и определяли их радиоактивность.

Модификацию ТРСазы с помощью азидо-АТР и азидо-GDP проводили по описанной нами ранее методике [9]. Реакционная смесь объемом 0,1—0,5 мл содержала $10^{-3}\text{--}5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ MgCl_2 , 0,05 М трис-НСI-буфер (рН 7,5) либо 0,05 М Na-ацетатный буфер (рН 6,0), 0,1—0,4 мкг/мл ТРСазы,

$5 \cdot 10^{-5}$ — $2 \cdot 10^{-4}$ М [^{14}C] (или [^3H]) азидо-АТФ либо [^{14}C]азидо-GDP и другие субстраты и ингибиторы (см. подписи к рисункам). Реакционную смесь делили на две части. Одну часть облучали УФ-светом в кварцевой кювете при 10° , другую инкубировали в темноте в тех же условиях. Для облучения применяли лампу СВД-120А с фильтром БС-4 либо фильтром из плексигласа, пропускающим область спектра с длиной волны выше 300 нм. Пробы объемом 20 мкл отбирали через различные интервалы времени и использовали для определения степени модификации ТРСазы или определения активности фермента в реакциях обмена и аминокислотирования.

Определение степени модификации ТРСазы *n*-азидоанилидами нуклеотидов проводили двумя способами.

1. 20 мкл облученного в присутствии аналога белка наносили на колонку с сефадексом G-100, тонким ($0,4 \times 5$ см), уравновешенную 0,05 М трис-НСI-буфером (рН 8), содержащим 0,1 М NaCl. Колонку промывали этим же буфером. Элюат собирали по каплям (30—40 мкл) на нитроцеллюлозные фильтры. Определяли количество радиоактивности, сорбированной на фильтрах, и общую сумму радиоактивности, элюированной вместе с белком. Такой же процедуре подвергали темновой опыт. Количество аналога, присоединенного ковалентно, определяли по разнице радиоактивности пика белка в первом и во втором случае.

2. Пробу объемом 20 мкл разбавляли 2 мл 0,05 М трис-НСI-буфера (рН 8), содержащего 10^{-3} М АТФ, и наносили на нитроцеллюлозный фильтр (НУФС). Фильтр промывали 3 раза по 4 мл тем же буфером. Степень ковалентного присоединения определяли по разнице в количестве радиоактивности облученной и темновой проб. Сопоставление результатов, полученных двумя методами, показывает, что белок сорбируется на нитроцеллюлозных фильтрах с эффективностью 70%.

n-Азидоанилин синтезировали из *n*-аминоацетанилида по методу [21]. Полученный продукт имел $T_{пл}$ 60 — 62° и содержал 95—100% азидогруппы. Продукт был гомогенным в системах А и В (см. ниже) при ВХ. В ИК-спектре соединения присутствовала характерная для азидогруппы полоса поглощения в области 2120 см^{-1} .

Синтез *n*-азидоанилидов ди- и трифосфатов нуклеозидов проводили по разработанному ранее в нашей лаборатории методу [11] с некоторыми изменениями.

Вариант А. 40 мг *n*-азидоанилина (0,3 ммоль) растворяли в 5 мл воды, нагревали с перемешиванием до 50° и добавляли немного активированного угля Norit А. Раствор фильтровали через бумажный фильтр (в случае свежеполученного *n*-азидоанилина необходимости в обработке активированным углем нет). Объем фильтрата доводили до 5 мл, раствор охлаждали до 10° и добавляли 10 мкмоль нуклеозидди- или трифосфата. Раствор титровали 1 М НСI до рН 5,6. К смеси добавляли 100 мг ЦМЭ-КДИ и рН среды вновь доводили до 5,6. Смесь перемешивали в течение 10 мин, постоянно поддерживая рН среды равным 5,6. Затем добавляли еще 100 мг ЦМЭ-КДИ. Смесь оставляли на 40—60 мин, постоянно поддерживая рН 5,6 с помощью 1 М НСI. После окончания реакции (определяли по прекращению подщелачивания реакционной смеси) рН раствора доводили до 8,5 добавлением триэтиламина, охлаждали в течение 10 мин при 4° , фильтровали через стеклянный фильтр, разбавляя водой до 50 мл, и наносили на колонку с ДЕАЕ-целлюлозой (60—100 мл) в НСO_3 -форме. Колонку промывали 400—500 мл 0,01 либо 0,02 М ТЭАБ, рН 7,5, для аналогов ди- и трифосфатов соответственно. Продукт элюировали в линейном градиенте ТЭАБ, от 0 до 0,2 М для аналогов нуклеозиддифосфатов и от 0 до 0,3 М для аналогов нуклеозидтрифосфатов. Скорость элюции 30—60 мл/ч. Объем фракций 10 мл. За выходом продуктов реакции следили по поглощению при 260 нм. Фракции, поглощающие в УФ-свете, объединяли и упаривали на ротационном испарителе при температуре 30— 35° . Остаток

несколько раз растворяли в небольшом количестве воды и упаривали для удаления ТЭАБ. Выход продукта реакции 90—98%.

Вариант Б. 10 мкмоль динатриевой соли нуклеозидтрифосфата растворяли в 5 мл воды. К раствору добавляли 100—150 мг ЦМЭ-КДИ и титровали смесь до pH 5,8 1 М HCl. Это значение pH поддерживали до прекращения подщелачивания реакционной среды. Затем к раствору добавляли 40 мг (0,3 ммоль) перекристаллизованного *n*-азидоанилина и оставляли смесь при постоянном перемешивании на 40—60 мин. Дальнейшая обработка реакционной смеси аналогична первому способу. Выход продукта реакции 55—70%.

Вариант В. Синтез малых количеств высокоочищенного азидо-АТР (3—5 ОЕ₂₆₀) проводили в объеме 0,5—1 мл воды, содержащей 20—30% этилового спирта; *n*-азидоанилин и ЦМЭ-КДИ добавляли в том же соотношении к АТР, как в варианте А. Выход продукта 70—80%.

Чистоту продуктов проверяли микроколоночной хроматографией на DEAE-целлюлозе в градиенте NaCl, а также нисходящей хроматографией на ватмане 3 MM в системах 1 М ацетат аммония (pH 7,5) — этиловый спирт, 3 : 7 (А); изопропанол — аммиак — вода, 7 : 1 : 2 (Б). Хроматографическое поведение синтезированных соединений (приведены значения R_f в системах А и Б): азидо-ADP (0,36; 0,39), азидо-АТР (0,22; 0,25), азидо-GDP (0,32; 0,35), азидо-GTP (0,17; 0,18), азидо-СТР (0,33; 0,34).

При недостаточно хорошем разделении γ -амиды нуклеозидтрифосфатов содержали примесь дифосфата нуклеотида, а β -амиды нуклеозиддифосфатов — примесь монофосфатов нуклеозидов (от 2 до 5%). В этих случаях продукты подвергали дополнительной очистке на ватмане 3 MM в системе 1 М ТЭАБ (pH 7,5) — этиловый спирт, 3 : 7. Продукт наносили на лист бумаги в виде полосы шириной 14 см. Хроматографию проводили в темноте. После высушивания бумаги при комнатной температуре отрезали полоску с одного края листа шириной 2 см и помещали в хемископ. В месте локализации продукта через 15 мин появлялось красно-коричневое пятно. Продукт элюировали из полосы водой. Элюат несколько раз упаривали с водой до удаления ТЭАБ. Таким способом получали продукты 100% чистоты.

Авторы благодарны проф. Д. Г. Кнорре за постоянный интерес и внимание к работе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Santi D. V., Danenberg P. V., Montgomery K. A. (1971) *Biochemistry*, **10**, 4821—4824.
2. Santi D. V., Pena V. A. (1973) *J. Med. Chem.*, **16**, 273—280.
3. Blanquet S., Fayat G., Waller J.-P. (1974) *Europ. J. Biochem.*, **44**, 343—351.
4. Krauspe R., Parthier B. (1975) *Biochem. und Physiol. Pflanz.*, **168**, 257—266.
5. Ирасолов В. С., Крицын А. М., Михайлов С. Н., Флорентьев В. Л. (1975) Докл. АН СССР, **221**, 1226—1228.
6. Горшкова И. Н., Лаврик О. И. (1975) *Мол. биол.*, **9**, 887—892.
7. Ковалева Г. К., Иванов Л. Л., Мадоян И. А., Фаворова О. О., Северин Е. С., Гуляев Н. Н., Баранова Л. А., Шабарова З. А., Соколова Н. П., Киселев Л. Л. (1978) *Биохимия*, **43**, 525—533.
8. Akhverdyan V. Z., Kiselev L. L., Knorre D. G., Lavrik O. I., Nevinsky G. A. (1977) *J. Mol. Biol.*, **113**, 475—501.
9. Ankilova V. N., Knorre D. G., Kravchenko V. V., Lavrik O. I., Nevinsky G. A. (1975) *FEBS Letters*, **60**, 172—175.
10. Budker V. G., Knorre D. G., Kravchenko V. V., Lavrik O. I., Nevinsky G. A., Teplova N. M. (1974) *FEBS Letters*, **49**, 159—162.
11. Бабкина Г. Т., Зарягова В. Ф., Кнорре Д. Г. (1975) *Биоорганическая химия*, **1**, 611—615.
12. Patai S. (1974) *The Chemistry of the Azido Group*, John Wiley and Sons, New York and London, p. 26.
13. Anderson W. F., Fletterick R. J., Steitz T. A. (1974) *J. Mol. Biol.*, **86**, 261—269.
14. Fletterick R. J., Bates D. J., Steitz T. A. (1975) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**, 38—42.

15. Фаворова О. О., Кочкина Л. Л., Шайго М., Парин А. В., Хилько С. Н., Прасолов В. С., Киселев Л. Л. (1974) Мол. биол., 8, 729—741.
16. Maxwell I. M., Wimmer E., Tener G. M. (1968) Biochemistry, 7, 2629—2634.
17. Nevinsky G. A., Favorova O. O., Lavrik O. I., Petrova T. D., Kochkina L. L., Savchenko T. I. (1974) FEBS Letters, 43, 135—138.
18. Dorizzi M., Merault G., Fournier M., Labouesse J., Keith G., Dirheimer G., Buckingham R. H. (1977) Nucleic Acids Res., 4, 31—42.
19. Silberrad O., Smart D. I. (1906) J. Chem. Soc., 89, 170—171.

Поступила в редакцию
5.V.1978

После доработки
9.X.1978

FINDING OF TWO TYPES OF THE NUCLEOTIDE-BINDING SITES IN THE TRYPTOPHANYL-tRNA-SYNTHEASE AND THEIR MODIFICATION

NEVINSKY G. A., LAVRIK O. I., FAVOROVA O. O., KISSELEV L. L.

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

ne interactions were investigation between beef pancreas tryptophanyl-tRNA synthetase and AMP, GMP, CMP, ADP, GDP, as well as *p*-azidoanilides of ADP, GDP, ATP, GTP and CTP. All these compounds were able to activate the ATP-[³²P]pyrophosphate exchange, the maximum effect being observed within the concentration range of 1—5 μM for AMP, GMP, CMP, and ADP or GDP *p*-azidoanilides, and the 10—50 μM range either for ADP and GDP, or ATP, GTP and CTP *p*-azidoanilides. At higher concentrations these nucleoside phosphates and their analogs behave as mixed-type inhibitors with respect to ATP in the ATP-[³²P]pyrophosphate exchange reaction. Both ATP and GMP protect against UV-induced addition of 2 moles of γ-(*p*-azidoanilide)-ATP per mole of the enzyme; the mixture of two nucleotides prevents binding of 4 moles of the latter compound. The covalent attachment of β-(*p*-azidoanilide)-GDP to the enzyme abolishes the activating action of the nucleoside phosphates. The data presented suggest that the enzyme possesses not only the substrate ATP-site but the nucleotide-binding sites of some other type which may serve for the effector binding.
