



УДК 547.963.3.04+577.159.02:543.426

КРЕАТИНКИНАЗА ИЗ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ КРОЛИКА.
ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНЫХ ЦЕНТРОВ С ПОМОЩЬЮ
ФОТОАКТИВНЫХ АНАЛОГОВ1, N⁶-ЭТЕНОАДЕНОЗИН-5'-ДИ- И ТРИФОСФАТОВ

Денисов А. Ю., Невитский Г. А., Лаврик О. И.

Институт органической химии Академии наук СССР
Сибирского отделения, Новосибирск

Исследованы γ -(*n*-азидоанилид) ϵ ATP и β -(*n*-азидоанилид) ϵ ADP в качестве аффинных необратимых ингибиторов креатинкиназы из скелетных мышц кролика. При растворении этих соединений в 50% водном этаноле флуоресценция меток увеличивается в 2–3 раза. Аналогичный результат наблюдается при ковалентном присоединении меток к ферменту. Предполагается, что увеличение флуоресценции связано с разрушением специфического взаимодействия между ароматической группировкой при концевом фосфате и остатком этеноаденина аналогов ϵ ATP и ϵ ADP. Ковалентное присоединение аналогов к ферменту происходит вблизи активных центров креатинкиназы так, что модифицированный фермент не может катализировать превращения субстратов, но способен связывать нуклеотиды, креатин и креатинфосфат. Модификация практически не искажает нуклеотидсвязывающие участки фермента: K_D комплексов модифицированной креатинкиназы с ATP и ADP, измеренные с помощью присоединенной метки (350 и 30 мкМ соответственно), близки к величинам средства этих субстратов к нативному ферменту. Связывание нуклеотидов происходит в две стадии: ассоциация и более медленная изомеризация комплекса. Скорости изомеризации комплексов фермента с ATP и ADP существенно различны. Креатин и креатинфосфат практически не влияют на средство нуклеотидов к модифицированному ферменту, но заметно (в 2 и более раз) увеличивают скорость изомеризации комплексов фермента с субстратами.

Креатинкиназа из скелетных мышц кролика катализирует обратимую реакцию переноса фосфорильного остатка с $Mg \cdot ATP$ на креатин. Фермент состоит из двух субъединиц примерно одипакового молекулярного веса (41 000) [1]. Ранее была показана структурно-функциональная неидентичность субъединиц креатинкиназы из скелетных мышц кролика и исследована аффинная модификация фермента с помощью γ -(*n*-азидоанилидов) ATP и ϵ ATP [2]. В данной работе продолжено исследование активных центров фермента с помощью фотоактивных аналогов ϵ ATP и ϵ ADP.

Синтез и флуоресцентные характеристики азидо- ϵ ATP и азидо- ϵ ADP описаны в работе [3]. Показано, что интенсивность флуоресценции этих аналогов существенно меньше интенсивности флуоресценции ϵ ATP и ϵ ADP. В работе [3] сделано предположение о специфическом взаимодействии между ароматической группировкой при концевом фосфате и этеновой группой этих меток. Чтобы смоделировать такое взаимодействие, в данной работе проведено исследование тушения флуоресценции свободной ϵ ATP анилином и *n*-азидоанилином. Данные обрабатывались по методу Штерна – Фольмера [4]:

$$I_0/I = 1 + K[Q], \quad (1)$$

где I_0 и I – изначальная и измеренная при добавлении тушителя интенсивность флуоресценции метки, K – константа Штерна – Фольмера, $[Q]$ – концентрация тушителя. Константу определяли из наклона прямой I_0/I от $[Q]$, построенной по экспериментальным точкам.

Сокращения: креатинкиназа – АТФ-креатинфосфотрансфераза (КФ 2.7.3.2), ϵ ATP – 1, N⁶-этино-АТФ; ϵ ADP – 1, N⁶-этино-АДП; азидо- ϵ ATP – γ -(*n*-азидоанилид) 1, N⁶-этино-АТФ; азидо- ϵ ADP – β -(*n*-азидоанилид) 1, N⁶-этино-АДП; TNS – 2-толуидино-нафтален-6-сульфонат; NEPES – 2-N-гидроксэтилпиперазин-N'-2-этансульфокислота.

Величины констант Штерна – Фольмера тушения
флуоресценции этенометок, рассчитанные из уравнения (1)

Метка	Тушитель	K, M^{-1}
εАТР	Анилин	500±100
	<i>n</i> -Азидоанилин	8500±1200
Азидо-εАТР	KI	120±10
	KI	20±2
	KI	90±15
Азидо-εАТР, ковалентно присоединенный к ферменту		

Результаты (таблица) показывают, что *n*-азидоанилин — более эффективный тушитель флуоресценции εАТР, чем анилин. Это хорошо согласуется с существенно меньшим квантовым выходом флуоресценции *n*-азидоанилидов εАТР и εАДР по сравнению с анилидами εАТР и εАДР [3]. Вероятно, тушение флуоресценции в исследуемых аналогах происходит при соударениях ароматической группировки при концевом фосфате с этеноадеином (динамический механизм тушения флуоресценции), но возможно и существование некоторой части молекул аналогов в нефлуоресцентном состоянии вследствие, например, стеклинг-взаимодействия их ароматических частей (статический механизм).

Подобные взаимодействия ароматических группировок при концевой фосфате с основаниями нуклеотидов, приводящие к сильному уменьшению квантового выхода и времен жизни флуоресценции, ранее наблюдались на целом ряде соединений: εNAD [5], аналогах нуклеотидов с флуоресцентной группой, присоединенной по γ-фосфату [6], флуоресцентных динуклеотидах [7]. Исследования, проведенные методом ЯМР, показали, что часть таких молекул находится в стеклинг-состоянии.

При исследовании тушения флуоресценции этенометок с помощью KI было обнаружено, что тушение флуоресценции εАТР облегчено по сравнению с азидо-εАТР примерно в 6 раз (таблица). Возможно, это следствие уменьшения времени жизни флуоресценции азидо-εАТР по сравнению с εАТР, аналогичное изменениям в вышеприведенных соединениях, или результат уменьшения доступности этеногруппы ионам пода в аналоге εАТР, вызванный экранированием этеногруппы ароматической группировкой при γ-фосфате εАТР.

Исследовалась возможность уменьшения взаимодействия ароматических фрагментов молекул азидо-εАТР и азидо-εАДР в слабополярных средах. Спектры флуоресценции этих соединений в воде и 50% водном этаноле (рН 7,5) показывают (рис. 1), что максимум флуоресценции в спиртовом растворе сдвигается в коротковолновую область ($\lambda_{\text{макс}}$ 400 нм), спектры возбуждения флуоресценции не изменяются. Квантовый выход флуоресценции εАТР и εАДР слабо зависит от полярности среды при нейтральных рН [8], однако для аналогов εАТР и εАДР увеличивается в 2–3 раза в спиртовом растворе по сравнению с водным, что, видимо, связано с изменением конформации аналогов в спиртовом растворе.

Нарушение взаимодействия ароматических частей метки также, по-видимому, наблюдается при взаимодействии азидо-εАТР с креатинкиназой. Ранее [2] было показано, что ковалентное присоединение аналога к ферменту приводит к возрастанию интенсивности флуоресценции метки в 4–5 раз. В данной работе было исследовано тушение флуоресценции ковалентно присоединенной метки с помощью KI (таблица). Оказалось, что флуоресценция присоединенной метки тушится практически так же, как и свободной εАТР. Это свидетельствует о хорошей доступности модифицированного основания нуклеотида ионам пода в активном центре фермента, а также о значительном уменьшении эффективности взаимодействия ароматических группировок в азидо-εАТР после ковалентного присоединения к ферменту.

Спектр испускания флуоресценции ковалентно присоединенной метки практически не отличается от такового для εАТР (рис. 2). Отсутствие

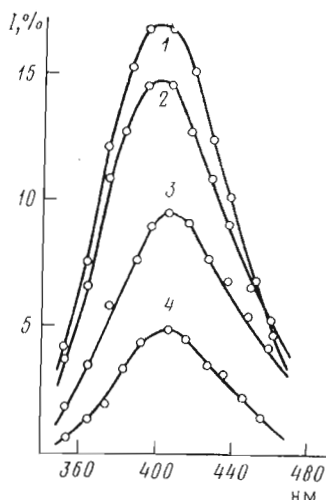


Рис. 1

Рис. 1. Спектры флуоресценции азидо-εADP и азидо-εATP в 50% водном этаноле (1 и 2 соответственно) и воде (3 и 4) при нейтральных рН. За 100% принят квантовый выход флуоресценции εATP. Флуоресценция возбуждалась при 305 нм

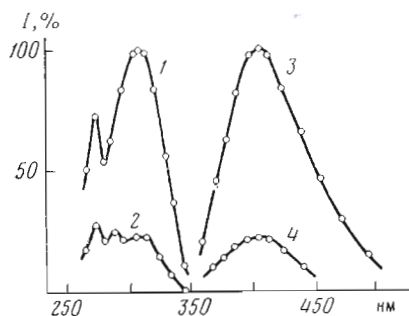


Рис. 2

Рис. 2. Спектры возбуждения и испускания флуоресценции εATP (1 и 3 соответственно) и азидо-εATP, ковалентно присоединенного к ферменту (2 и 4); возбуждение при 315 нм, рН 7,5

сдвига максимума флуоресценции метки на ферменте по сравнению со свободным состоянием в растворе, видимо, может свидетельствовать о хорошей доступности метки молекулам воды в активном центре фермента.

Было изучено также изменение собственной флуоресценции креатинкиназы при модификации ее азидо-εATP. Замечено сильное уменьшение флуоресценции фермента после модификации, причем зависимости степени модификации фермента (полученные измерением активности креатинкиназы) хорошо коррелируют с уменьшением его флуоресценции. Тушению, вероятно, подвергаются остатки триптофана креатинкиназы, находящиеся вблизи активного центра [9]. Рассчитанный согласно работе [9] радиус Фёрстера индуктивно-резонансного переноса энергии с остатков триптофана фермента на ковалентно присоединенную метку равен 17 ± 2 Å, что объясняет возможность переноса энергии на больших расстояниях между люминофорами, а следовательно, сильное тушение флуоресценции фермента и появление дополнительного пика (λ 290 нм) в спектрах возбуждения флуоресценция присоединенной этенометки (рис. 2).

Возрастание флуоресценции азидо-εATP при ковалентном присоединении к ферменту, по-видимому, связано с изменением конформации метки после присоединения и уменьшением эффективности взаимодействия ароматических частей метки. К альтернативному способу объяснения такого изменения свечения метки относится возможное уменьшение вероятности тушения флуоресценции этеногруппы из-за изменения в структуре метки (разрушение азидной группировки при присоединении). Однако такое разрушение азидогруппы свободной азидо-εATP не вызывало возрастания свечения метки [2], что подтверждает предположение об изменении конформации метки в ковалентном комплексе с креатинкиназой. К аналогичному мнению мы пришли и при объяснении результатов тушения метки ионами йода.

Ранее [2, 3] было показано, что добавление ATP и ADP к модифицированному ферменту увеличивает флуоресценцию метки. С помощью метода, описанного в работах [2, 3], были оценены величины K_D комплексов модифицированного фермента с ADP (30 ± 10 мкМ) и ATP (350 ± 100 мкМ).

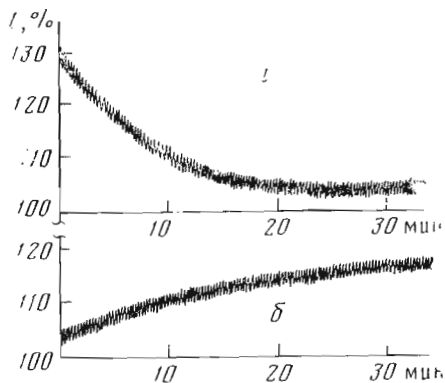


Рис. 3

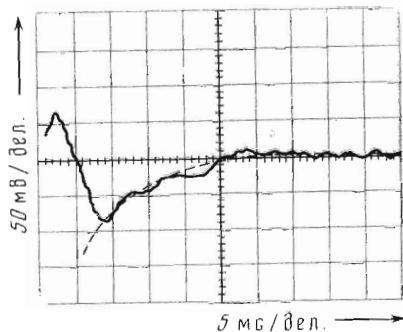


Рис. 4

Рис. 3. Флуориметрическое измерение активности креатинкиназы: *a* — обратная реакция, [ADP] 100 мкМ, [креатинфосфат] 1 мМ; *б* — прямая реакция, [АТФ] 150 мкМ, [креатин] 1 мМ

Рис. 4. Увеличение интенсивности флуоресценции метки, ковалентно присоединенной к ферменту, во времени при добавлении 0,5 мМ ADP. Условия проведения опыта см. в «Экспериментальной части». Полный сигнал — 8 В

Рис. 5. Зависимость скорости реакции связывания фермента, модифицированного азидо-εАТФ, с ADP ($1/\tau$) от концентрации ADP (*a*) и результаты, представленные в координатах для определения констант скорости изомеризации из уравнения (3) (*б*)

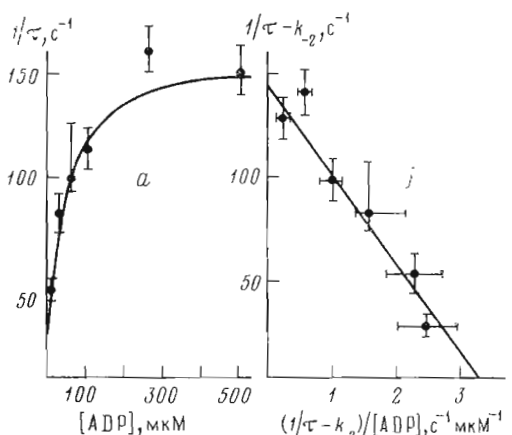


Рис. 5

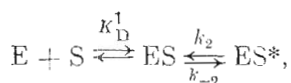
Добавление в смесь креатина и креатинфосфата не изменяло связывания нуклеотидов. Ранее рядом авторов были получены следующие величины констант диссоциации субстратов для нативного фермента: 50–100 мкМ для АТФ и ADP с помощью флуоресцентного зонда TNS [10]; 120–160 мкМ для ADP и 400–800 мкМ для АТФ по тушению собственной флуоресценции креатинкиназы [11, 12]. Также известно, что константы Михаэлиса для АТФ и ADP различаются в 6–10 раз (50 мкМ для ADP и 300–500 мкМ для АТФ [4]). Совокупность приведенных данных указывает на различное сродство АТФ и ADP к ферменту. Отсутствие различия в K_D , полученных с помощью TNS, по-видимому, связано с тем, что TNS является активатором креатинкиназы [10].

Свойство нуклеотидов увеличивать флуоресценцию ковалентно присоединенной к ферменту метки и различие в сродстве АТФ и ADP к модифицированному ферменту было использовано для флуориметрического измерения активности креатинкиназы. В качестве индикатора использовали полностью модифицированный азидо-εАТФ препарат фермента (рис. 3). Кроме субстратов реакционная смесь содержала 10 мкМ препарат полностью модифицированного азидо-εАТФ фермента, 5 мМ ацетат магния, 10^{-7} М нативный фермент, добавленный в точке $t=0$. Амплитуда изменения флуоресценции в случае «б» меньше, так как равновесие в образующейся смеси субстратов сдвинуто в сторону образования АТФ ($K_{равн} = [ADP] \cdot [креатинфосфат] / [АТФ] \cdot [креатин] = 3 \cdot 10^{-2}$ [1]). К недостаткам метода относится ограничение по концентрации используемых в реакции нуклеотидов ($[АТФ] + [ADP] < 0,5$ мМ), так как при высоких концен-

трациях нуклеотидов происходит насыщение модифицированного фермента субстратами.

Возможность получения констант связывания субстратов с модифицированной аффинной меткой креатинкиназой, сравнимых с аналогичными константами, полученными для нативного фермента, указывает на то, что ковалентное присоединение химически активного аналога к ферменту происходит вблизи активного центра креатинкиназы и существенно не искажает ее нуклеотидсвязывающих участков. Вероятно, после ковалентного присоединения конформация соединительного фрагмента между белком и остатком этеноаденина не позволяет основанию нуклеотида оставаться в нуклеотидсвязывающем участке фермента. В связи с этим аффинная модификация креатинкиназы не мешает свободному связыванию субстратов.

Модифицированный с помощью азидо- ϵ -АТР препарат креатинкиназы представляется удобным для изучения скоростей связывания субстратов с ферментом. На рис. 4 приведена кривая изменения интенсивности флуоресценции ковалентно присоединенной метки во времени при добавлении АDP, полученная методом остановленной струи [13]. Аналогичные результаты получены при разных концентрациях субстратов. Результаты обрабатывались в предположении псевдопервого порядка реакции связывания по методу Гуггенгейма [13]. Полученная нами зависимость скорости реакции связывания АDP с модифицированным ферментом от концентрации АDP (рис. 5) согласуется со схемой связывания субстратов с креатинкиназой, предложенной ранее [11]:



где первый процесс (ассоциация) существенно быстрее второго (изомеризация комплекса). Для $[E]_0 \ll [S]_0$ скорость реакции, получаемая в эксперименте ($1/\tau$ или кажущаяся скорость), следующая:

$$1/\tau = k_2 [S]_0 / ([S]_0 + K_D^1) + k_{-2} \quad (2)$$

или

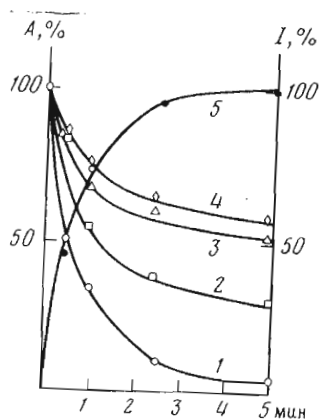
$$1/\tau - k_{-2} = k_2 - (1/\tau - k_{-2}) K_D^1 / [S]_0. \quad (3)$$

На рис. 5б результаты связывания модифицированного фермента с АDP представлены в координатах для получения k_2 и K_D^1 из уравнения (3). Значение k_{-2} определяли из уравнения (2) при малых концентрациях субстрата (рис. 5а).

Были определены следующие величины констант: для связывания с АDP — k_{-2} 20 с⁻¹, k_2 145 с⁻¹, K_D^1 45 мкМ; для связывания с АТР — k_{-2} 12 с⁻¹, k_2 40 с⁻¹, K_D^1 240 мкМ. Таким образом, скорость изомеризации фермента при комплексообразовании с АDP в 3 раза больше, чем для случая связывания с АТР, что еще раз свидетельствует о различии в связывании этих субстратов с креатинкиназой.

Как было указано выше, креатин и креатинфосфат практически не влияют на сродство нуклеотидов к модифицированному ферменту. В то же время их присутствие существенно сказывается на скорости изомеризации комплекса фермента с нуклеотидами. При концентрациях креатина и креатинфосфата 5–10 мМ и 0,05 мМ АТР скорость ферментативной реакции ($1/\tau$) равна 100–170 с⁻¹, в отсутствие креатина и креатинфосфата — 40–60 с⁻¹. В аналогичных условиях для связывания АDP — больше 500 с⁻¹ (мертвое время прибора) и 150–170 с⁻¹ соответственно. Таким образом, между участками связывания нуклеотидов и гуанидиновых субстратов наблюдается взаимодействие, облегчающее стадию изомеризации комплекса модифицированной креатинкиназы с АТР и АDP.

Рис. 6. Зависимость активности фермента от времени облучения с 40 мкМ азидо- ϵ ADP в отсутствие защищающих реагентов (1), в присутствии 2,4 мМ ϵ ATP (2), 3,3 мМ γ -анилида ϵ ATP (3), 5 мМ ADP и 5 мМ креатинфосфата (в начальный момент) (4) и зависимость (увеличение) интенсивности флуоресценции системы во времени, соответствующая условиям кривой 1 (5)



Исследование модификации фермента азидо- ϵ ADP показало (рис. 6), что облучение ультрафиолетовым светом смеси креатинкиназы с азидо- ϵ ADP приводит к необратимой инактивации фермента. Лиганды (ADP, креатинфосфат, ϵ ATP и др.) защищают креатинкиназу от инактивации, что указывает на специфичность процесса модификации. Скорость модификации фермента с помощью азидо- ϵ ADP в 2–3 раза меньше, чем в случае азидо- ϵ ATP (при концентрации аналогов 40 мкМ). Это скорее всего связано с разным средством к ферменту аналогов. Ранее [3] было установлено, что азидо- ϵ ATP и азидо- ϵ ADP имеют практически равные времена распада азидогруппы при облучении их растворов ультрафиолетовым светом. В то же время величины средства этих аналогов к ферменту существенно различаются: K_D для азидо- ϵ ATP составляет $3,5 \pm 1$ мкМ [2], а для азидо- ϵ ADP — 20 ± 5 мкМ (результаты получены методом флуоресцентного титрования с использованием TNS [2]). Ковалентное присоединение азидо- ϵ ADP к ферменту приводит к возрастанию флуоресценции метки по сравнению со свободным азидо- ϵ ADP в 3–4 раза. Как и в случае азидо- ϵ ATP, наблюдается хорошая корреляция между кривыми инактивации фермента и ростом флуоресценции метки во времени (рис. 6).

В целом прослеживаются достаточно общие закономерности при модификации фермента азидо- ϵ ATP [2] и азидо- ϵ ADP. Последовательная модификация креатинкиназы с помощью азидо- ϵ ADP после модификации креатинкиназы азидо- ϵ ATP до полной инактивации фермента и максимального увеличения флуоресценции метки не вызывала дополнительного возрастания флуоресценции реакционной смеси. Аналогичная ситуация наблюдается при использовании аналогов в обратной последовательности: азидо- ϵ ATP после азидо- ϵ ADP. Эти результаты свидетельствуют о том, что аналоги, по-видимому, связываются одним и тем же участком молекулы креатинкиназы.

Особый интерес представляет модификация фермента азидо- ϵ ADP при концентрациях аналога 20 мкМ и ниже. Наблюдается различие в скоростях модификации субъединиц креатинкиназы. Результаты согласуются с данными о разной скорости модификации ее субъединиц с помощью γ -(*n*-азидоанилидов) ATP и ϵ ATP [2].

Таким образом, проведенные исследования указывают на перспективность использования *n*-азидоанилидов ϵ ATP и ϵ ADP для исследования структурных и функциональных характеристик нуклеотидсвязывающих ферментов.

Экспериментальная часть

В работе использовали препарат креатинкиназы из скелетных мышц кролика, полученный по методу Кьюби в модификации Четвериковой с сотр. [14]. Удельная активность фермента 100 мкэкв H^+ /мг·мин. Препарат был любезно предоставлен Ж. И. Акопяном (Институт экспериментальной биологии, Ереван).

Получение γ -(*n*-азидоанилида) ϵ АТР и β -(*n*-азидоанилида) ϵ АДР описано ранее [3]. Препараты ϵ АТР и ϵ АДР любезно предоставлены Р. И. Гвоздевым (Институт химической физики, Черноголовка).

В работе использовали АТР, АДР, креатин и креатинфосфат (Reanal, ВНР), TNS, калиевую соль (Serva, ФРГ), НЕРЕС (Ferak, ФРГ), сефадекс G-100 (грубый, Pharmacia, Швеция).

УФ-облучение креатинкиназы в присутствии аналогов ϵ АТР и ϵ АДР проводили с помощью ртутной лампы СВД-120 А с фильтром из органического стекла (интенсивность падающего света $2 \cdot 10^{17}$ квант/с, $\lambda > 300$ нм). Облучаемая смесь содержала 10 мкМ креатинкиназу, 20–40 мкМ фотоактивный аналог, 5 мМ ацетат магния, 0,05 НЕРЕС/NaOH, pH 7,5. Для изучения защиты от модификации в смесь добавляли лиганды в 100-кратном избытке по отношению к метке. Модифицированный фермент отделяли от низкомолекулярных лигандов гель-фильтрацией на сефадексе G-100 [2].

Активность креатинкиназы определяли, наблюдая за протеканием обратной реакции колориметрическим методом [14] по образованию креатина. Реакционная смесь содержала 5 мМ АДР, 5 мМ креатинфосфат, 5 мМ ацетат магния и 0,5 мкг креатинкиназы. Реакцию проводили в буферных растворах 0,05 М НЕРЕС/NaOH, pH 7,5, и 0,05 М $\text{NaCH}_2\text{COO}/\text{NaOH}$, pH 5.

Флуоресценцию этенометок измеряли на спектрофлуориметре «Hitachi MPF-2A» (Япония) и спектрофотометре «Durrum D-110» (США). Флуоресценцию возбуждали при λ 305 нм (в опытах с модифицированным ферментом при 315 нм) и наблюдали на максимуме флуоресценции 405 нм или используя фильтр к прибору с длиной волны пропускания света выше 340 нм (Corning O-52). Собственную флуоресценцию фермента наблюдали при 330 нм ($\lambda_{\text{возб}}$ 290 нм). Флуоресценцию TNS регистрировали при 435 нм ($\lambda_{\text{возб}}$ 375 нм).

Флуоресцентное титрование проводили в буферном растворе 0,05 М НЕРЕС/NaOH, pH 7,5, содержащем 5 мМ ацетат магния. В разных экспериментах смеси содержали 20–40 мкМ растворы этенометок, 2–8 мкМ креатинкиназу, 17 мкМ TNS. К смеси добавляли лиганды или тушители флуоресценции и регистрировали изменение флуоресценции с учетом поправки на разбавление. Общий вид спектров флуоресценции при этом сохранялся.

В экспериментах по изучению связывания субстратов с ферментом методом остановленной струи растворы смешивались в соотношении 1 : 1. Смесь содержала 1 мкМ креатинкиназу, 5 мМ ацетат магния, 0,05 М НЕРЕС/NaOH, pH 7,5, и различные концентрации добавляемых лигандов. Процессы связывания лигандов с ферментом регистрировались по изменению интенсивности свечения метки на ферменте во времени на запоминающем осциллографе фирмы «Tektronix», модель 5103 N. Для возбуждения флуоресценции использовали ксеноновую лампу к прибору (75 Вт).

Авторы выражают благодарность проф. Д. Г. Кнорре за постоянный интерес и обсуждение работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Watt D. S. In: The Enzymes. London — New York: Acad. Press, 1973, v. 8, p. 383–455.
2. Денисов А. Ю., Невинский Г. А., Лаврик О. И. Биохимия, 1982, т. 47, № 2.
3. Невинский Г. А., Денисов А. Ю. Биоорг. химия, 1981, т. 7, № 11, с. 1693–1700.
4. Владимиров Ю. А., Добрецов Г. Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. М.: Наука, 1980.
5. Luisi P. L., Baici A., Bonner F. J., Aboderin A. A. Biochemistry, 1975, v. 14, № 2, p. 362–368.
6. Yarbrough L. R., Boch J. L. J. Biol. Chem., 1980, v. 255, № 20, p. 9907–9911.
7. Tolman C. L., Barrio J. R., Leonard N. J. Biochemistry, 1974, v. 13, № 24, p. 4869–4878.
8. Leonard N. J., Tolman C. L. In: Annual N. Y. Academy of Science. N. Y.: Acad. Press, 1975, v. 255, p. 43–58.
9. Vasak M., Nagayama K., Wüthrich K., Mertens M. L., Kägi J. H. R. Biochemistry, 1979, v. 18, № 23, p. 5050–5055.

10. Бунева В. Н., Горшкова И. И., Лаврик О. И., Мустаев А. А., Попов Р. А. Молекулярн. биология, 1980, т. 14, № 6, с. 1308–1312.
11. Hammes C. J., Herst J. K. Biochemistry, 1969, v. 8, p. 1083–1094.
12. Merlens M. L., Kägi J. H. R. Anal. Biochem., 1979, v. 96, № 2, p. 448–455.
13. Фершт Э. Структура и механизм действия ферментов. М.: Мир, 1980, с. 131, 199.
14. Четверикова Е. П., Кринская А. В., Розанова Н. А., Рыбина В. В., Алиевская Л. Л. Биохимия, 1970, т. 35, № 5, с. 953–961.

Поступила в редакцию
22.V.1981

**CREATINE KINASE FROM RABBIT SKELETAL MUSCLE: INVESTIGATION
OF ACTIVE SITES USING PHOTOREACTIVE ANALOGS
OF 1, N⁶-ETHENOADENOSINE-5'-DI- AND TRIPHOSPHATES**

DENISOV A. YU., NEVINSKY G. A., LAVRIK O. I.
*Institute of Organic Chemistry, Siberian Branch of the Academy
of Sciences of the USSR, Novosibirsk*

γ -(*p*-Azidoanilidate)-1,N⁶-ethenoATP and β -(*p*-azidoanilidate)-1,N⁶-ethenoADP were used as affinity reagents for creatine kinase from rabbit skeletal muscle. Covalent binding of the analogs to the enzyme evokes a 3–5-fold increase in the label fluorescence. This effect seems to be connected with the destruction of specific interaction between the aromatic group at the terminal phosphate and ethenoadenine moiety. Binding of analogs takes place near the creatine kinase active sites in such a manner that the modified enzyme can no longer catalyze the substrate transformation, still binding nucleotides, creatine and creatine phosphate. Modification affects only slightly the nucleotide binding sites: K_D for ATP and ADP (350 and 30 μ M, respectively) are close to the respective values obtained with the native enzyme. Nucleotides combine with the enzyme in two stages, association being followed by a slower isomerization of the complex. The enzyme complexes with ATP and ADP differ markedly in their isomerization rates. Either creatine or creatine phosphate are practically without effect on the nucleotide affinity for the modified enzyme, but the enzyme-substrate isomerization rates are two-fold or more increased in their presence.