



УДК 577.159.04:547.495.3

СУЩЕСТВЕННЫЕ ДЛЯ АКТИВНОСТИ КАРБОКСИЛЬНЫЕ ГРУППЫ
ТРИПТОФАНИЛ-тРНК — СИНТЕТАЗЫ*Нурбеков М. К., Судакова Е. С., Фаворова О. О.**Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва*

Модификация карбоксильных групп триптофанил-тРНК — синтетазы водорастворимым СМЕ-карбодимидом приводит к инактивации фермента со скоростью, зависящей от pH и концентрации модификатора. Фермент, инактивированный при pH 5,5 на 100%, практически полностью восстанавливает активность в результате щелочной обработки (pH 9) и содержит не более 15% внутримолекулярных сшивок. 50%-ная инактивация в этих условиях достигается при связывании ~ 4 моль [^{14}C]СМЕ-карбодимида на 1 моль димерного фермента. Спектр КД модифицированного при pH 5,5 белка практически совпадает со спектром КД нативного фермента. Модифицированный белок сохраняет димерную структуру.

Ингибирование при pH 5,5 активности фермента в реакции аминокислотирования тРНК следует кинетике псевдопервого порядка и достигает 100%; активность в реакции $\text{ATP} - [^{32}\text{P}]\text{пирофосфатного обмена}$ ингибируется не полностью. Определение порядка реакции по концентрации ингибитора позволяет предполагать, что за инактивацию фермента в реакции аминокислотирования тРНК ответственны две карбоксильные группы. Характер защитного действия субстратов и влияние модификации на значения K_m в обеих реакциях согласуются с представлением, что модифицируемые карбоксильные группы белка участвуют в связывании низкомолекулярных лигандов (в первую очередь ATP) и в переносе активированного остатка триптофана на тРНК^{Trp}.

Метод химической модификации отдельных аминокислотных остатков молекулы фермента, особенно при отсутствии информации о его первичной и пространственной структуре, является ценным инструментом исследования их функциональной роли [1, 2]. Применительно к триптофанил-тРНК—синтетазе этот метод использовался ранее для установления роли сульфгидрильных [3, 4] и имидазольных групп [5].

В этой работе мы исследовали с помощью химической модификации роль карбоксильных групп триптофанил-тРНК^{Trp}—синтетазы (КФ 6.1.1.2; $\text{ATP} + \text{Trp} + \text{тРНК}^{\text{Trp}} = \text{AMP} + \text{PP}_i + \text{Trp-тРНК}^{\text{Trp}}$) для ее каталитической активности. Интерес к функциональной роли этих групп был вызван тем, что ранее мы обнаружили активное триптофанилированное производное фермента [6], в котором остаток триптофана был соединен с белковой молекулой ангидридной связью через ее карбоксильную группу [7]. Тот факт, что остаток триптофана переносится с карбоксильной группы фермента на тРНК^{Trp}, позволил предположить каталитическую роль этой группы.

Помимо участия в катализе карбоксильные группы фермента могут вовлекаться в связывание субстратов. Они могут образовывать водородные связи с гуаниновыми остатками тРНК [8–10] или входить в состав ионной пары с остатком аргинина в специфических участках узнавания гуанина [11]. Кроме того, карбоксильные группы могут вовлекаться в прямое взаимодействие с субстратной аминокислотой, акцентируя ее протонированную α -аминогруппу [12, 13]. Наконец, высказывались предположения, что карбоксильные группы синтетаз участвуют в образовании тройных комплексов с катионами двухвалентного металла и субстратами нуклеотидной природы [14, 15]. Обнаружение иона цинка, существенного для активности триптофанил-тРНК^{Trp}—синтетазы, а также тот факт, что модификация ее карбоксильных групп приводит к частичной потере цинка [16], сделали последнее предположение весьма вероятным для этого фермента.

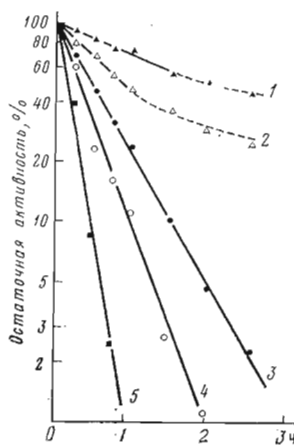


Рис. 1

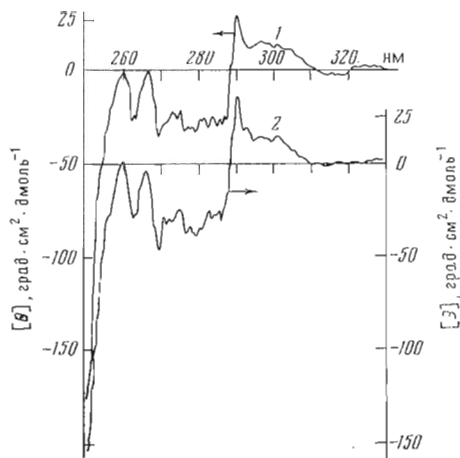
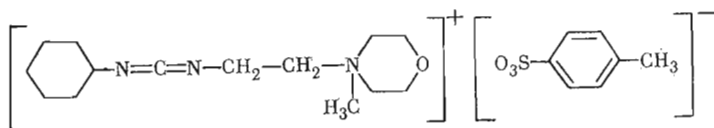


Рис. 2

Рис. 1. Кинетика инактивации триптофанил-тРНК-синтетазы при pH 5,5 СМЕ-карбодимидом в различных концентрациях (мМ): 1 - 1,44; 2 - 2,16; 3 - 3,6; 4 - 5,0; 5 - 7,2. Ось ординат дана в логарифмическом масштабе

Рис. 2. Спектры КД нативного (1) и модифицированного СМЕ-карбодимидом (pH 5,5; 3 ч) фермента (остаточная активность 36%) (2)

Удобными реагентами для избирательной модификации протонированных карбоксильных групп аспарагиновой и глутаминовой кислот в белках являются водорастворимые карбодимиды, реакция с которыми протекает в мягких условиях [17]. Для модификации триптофанил-тРНК-синтетазы использовали *n*-толуолсульфонат *N*-циклогексил-*N'*-[β-(*N*-метилморфолиний)этил] карбодимид (далее - СМЕ-карбодимид):



Этот реагент был ранее применен для специфической модификации карбоксильных групп фенилаланил-тРНК-синтетазы из *E. coli* MRE-600 [18]. Реакцию проводили без добавления нуклеофила, т. е. в условиях, когда *O*-ацилизоурейна, образующаяся в результате реакции карбоксильных групп с карбодимидом, изомеризуется в устойчивую *N*-ацилизоурейну [17, 19]. Поскольку основания катализируют эту реакцию [20], модификацию проводили в MOPS-KOH-буфере.

Таблица 1

Глубина ингибирования фермента, его реактивация и образование внутримолекулярных сшивок между субъединицами при различных условиях модификации

Условия модификации			Остаточная активность, %	Активность после обработки трис-HCl-буфером, pH 9, %	Содержание сшитых в димер субъединиц, %
pH	концентрация СМЕ-карбодимиды, мМ	время, ч			
6,8	—	6	100	100	0
	3,6	6	30	51	15
	7,2	6	25	—	18
	14	6	20	—	25
6,1	7,2	3	15	—	—
5,5	—	3	100	100	0
	3,6	3	0	94	12

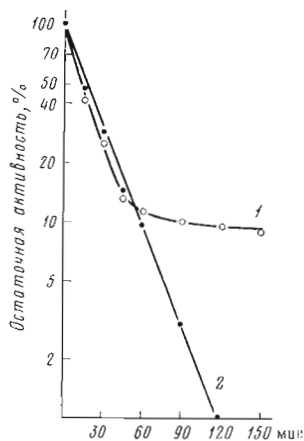


Рис. 3

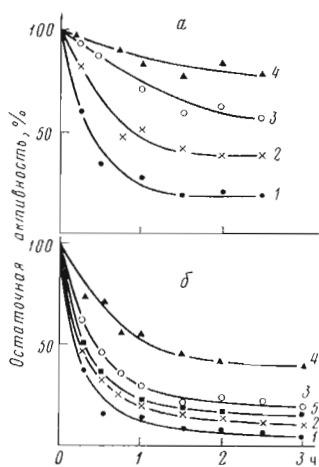


Рис. 4

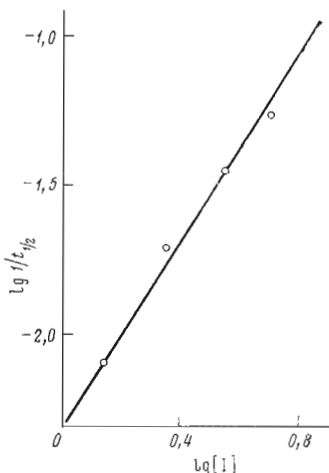


Рис. 5

Рис. 3. Кинетика ингибирования 7,2 мМ СМЕ-карбодимидом при pH 5,5 активности триптофанил-тРНК-синтетазы в реакциях АТР - $[^{32}\text{P}]$ пирофосфатного обмена (1) и аминоацилирования тРНК (2). Указано время преинкубации. Пробы при определении активности обоими методами в отличие от методик работы [5] содержали 10 мМ АТР и 5 мкМ $[^{14}\text{C}]$ триптофан.

Рис. 4. Влияние субстратов на инактивацию триптофанил-тРНК-синтетазы 3,6 мМ СМЕ-карбодимидом при pH 5,5 в реакции АТР - $[^{32}\text{P}]$ пирофосфатного обмена (а) и аминоацилирования тРНК^{ТТР} (б). 1 — преинкубация фермента без субстратов; 2 — с 0,2 мМ триптофаном; 3 — с 2 мМ АТР; 4 — с 0,2 мМ триптофаном и 2 мМ АТР; 5 — с 0,4 мкМ тРНК^{ТТР}. Во всех случаях пробы для преинкубации содержали 10 мМ MgCl_2

Рис. 5. Кажущийся порядок реакции по отношению к концентрации карбодимида (рассчитан как тангенс наклона прямой). Времена полудинактизации ($t_{1/2}$, мин) определены по данным рис. 1. Концентрации СМЕ-карбодимида — в мМ

Инкубация триптофанил-тРНК-синтетазы с СМЕ-карбодимидом вызывает инактивацию фермента в реакции аминоацилирования тРНК (рис. 1); ингибирующий эффект возрастает при увеличении концентрации модификатора и снижении pH (рис. 1, табл. 1).

Хотя карбодимидные реагенты взаимодействуют преимущественно с карбоксильными группами, они могут также реагировать (в основном при высоких значениях pH) с гидроксильными группами тирозина и SH-группами цистеина [17, 20]. В отличие от N-ацилмочевины образующиеся продукты неспецифической модификации стабильны в мягких щелочных условиях [1]. Щелочная обработка восстанавливает активность триптофанил-тРНК-синтетазы, модифицированной при pH 5,5, практически полностью и незначительно — после модификации фермента при pH 6,8 (табл. 1).

При модификации водорастворимыми карбодимидами, особенно в отсутствие нуклеофильного агента, другой побочной реакцией может быть образование внутри- и межмолекулярных сшивков [21]. Исходная триптофанил-тРНК-синтетаза является димером α_2 -типа (M 120 000) и при электрофорезе в денатурирующих условиях дает одну полосу с M 60 000 [22]. Анализ образцов фермента, модифицированного СМЕ-карбодимидом в разных условиях (табл. 1), методом электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия показал, что во всех случаях появляется полоса с M 120 000; ассоциатов с более высокой молекулярной массой не обнаружено. Чтобы выяснить, являются ли наблюдаемые сшивки двух субъединиц внутри- или межмолекулярными, образец, инактивированный на 100%, подвергали гель-фильтрации на ссфадексе G-200; его профиль элюции полностью совпадает с профилем элюции нативного фермента. Следовательно, в результате обработки СМЕ-карбодимидом не происходит ни олигомеризации молекул фермента, ни их диссоциации на субъединицы. Как видно из табл. 1, количество ковалентно сшитого димера не зависит от pH модификации, но возрастает с повышением концентрации ингибитора,

Влияние модификации СМЕ-карбодиимидом на значения K_m
триптофанил-тРНК-синтетазы

Препарат фермента	Глубина инактивации, %	K_m , М		
		триптофан *	АТР *	тРНКТр**
Исходный	0	$1,45 \cdot 10^{-7}$	$1,9 \cdot 10^{-3}$	$1,5 \cdot 10^{-7}$
Модифицированный	70	$2,4 \cdot 10^{-7}$	$7,2 \cdot 10^{-3}$	$0,8 \cdot 10^{-7}$

* В реакции АТР — [32 P]пирофосфатного обмена.

** В реакции аминоацилирования тРНК.

достигая в присутствии 14 мМ СМЕ-карбодиимида 25% (рН 6,8). Модифицированные при рН 5,5 образцы после щелочной реактивации, по данным электрофореза в денатурирующих условиях, не содержат внутримолекулярных ковалентных сшивок.

Приведенные данные позволяют заключить, что инактивацию карбодиимидом при рН 6,8 лишь частично можно объяснить модификацией карбоксильных групп: действительно, модифицированный фермент, проявляющий 30% остаточной активности, после щелочной обработки восстанавливает ее только до 50% (см. табл. 1). Ингибирование, сохраняющееся после щелочной обработки, может быть следствием как блокирования СМЕ-карбодиимидом других групп белковой молекулы, так и образования межсубъединичных сшивок. Напротив, при рН 5,5 инактивация является следствием специфической модификации карбоксильных групп белковой молекулы, о чем свидетельствует полная реактивация фермента при рН 9 (табл. 1). Образующиеся при рН 5,5 ковалентные сшивки, если и снижают активность фермента, по-видимому, не вносят значительного вклада в общую степень инактивации. Повышенные избирательности модификации карбоксильных групп карбодиимидами при снижении рН — известное свойство этой реакции [17, 21]. Все дальнейшие эксперименты проводили при рН 5,5.

Модификация триптофанил-тРНК-синтетазы СМЕ-карбодиимидом не приводит к сколько-нибудь значительным конформационным изменениям молекулы фермента, о чем свидетельствуют спектры КД в ближней (рис. 2) и дальней (200–250 нм) УФ-области.

Число модифицируемых карбоксильных групп оценивали по стехиометрии связывания [14 C]СМЕ-карбодиимида. 50%-ному ингибированию триптофанил-тРНК-синтетазы в реакции аминоацилирования тРНК соответствует включение ~4 моль модификатора на 1 моль димерного фермента. Тот факт, что из 216 остатков дикарбоновых аминокислот [23] доступными для модификации оказываются всего несколько, также, вероятно, свидетельствует об отсутствии существенных конформационных изменений в молекуле фермента. Действительно, нереакционность большей части остатков дикарбоновых аминокислот определяется их пространственной недоступностью или величиной рК ионизируемых групп, причем обе эти характеристики могут меняться при нарушении нативной структуры белка.

Чтобы установить, на какой стадии ферментативной реакции существуют модифицируемые карбоксильные группы, исследовали влияние СМЕ-карбодиимида на активирующую и ацилирующую активности триптофанил-тРНК-синтетазы. Одновременное исследование кинетики инактивации фермента в реакциях АТР — [32 P]пирофосфатного обмена и аминоацилирования тРНК (рис. 3) показало, что ингибирование ацилирующей активности следует кинетике псевдопервого порядка и достигает 100% (см. также рис. 1). Активность в реакции АТР — [32 P]пирофосфатного обмена вначале ингибируется почти с такой же скоростью, как и ацилирующая активность, а затем выходит на плато, соответствующее

~10% исходной активности. Эти данные позволяют предположить, что модифицируемые карбоксильные группы существенны на обеих стадиях реакции аминоацилирования тРНК^{Trp}. Большая чувствительность фермента к инактивации на стадии аминоацилирования тРНК связана, вероятно, с наличием модифицируемой карбоксильной группы, не влияющей на стадию образования аминоациладенилата, но существенной для переноса аминоацильного остатка с аминоациладенилата на тРНК^{Trp}. Выход кинетической кривой, характеризующей инактивацию фермента в реакции обмена на плато, может объясняться тем, что блокирование каких-либо карбоксильных групп ухудшает связывание низкомолекулярных субстратов.

Для доказательства локализации модифицируемых карбодимидом групп в активном центре фермента, а также для проверки предположений, сделанных исходя из сравнения характера ингибирования реакций обмена и ацилирования, исследовали влияние субстратов на ингибирование обеих активностей (рис. 4). Оказалось, что в обоих случаях триптофан защищает фермент от инактивации СМЕ-карбодимидом незначительно, АТР намного лучше, а совместное добавление низкомолекулярных субстратов в присутствии MgCl₂, т. е. в условиях образования триптофаниладенилата, обеспечивает наибольший защитный эффект. При этом защита низкомолекулярными субстратами более эффективна для реакции обмена (рис. 4а), чем для реакции ацилирования (рис. 4б), что подтверждает предположение о роли карбоксильных групп на обеих стадиях реакции.

Таким образом, защитное действие субстратов в сочетании с данными об отсутствии существенных конформационных изменений позволяет с большой степенью вероятности предполагать, что модифицируемые карбоксильные группы локализованы в активном центре фермента или вблизи него и являются существенными для связывания лигандов или катализа. Однако эти данные не исключают возможности косвенного влияния модификации экспонированных остатков на активность фермента. Это влияние может быть опосредовано через конформационные изменения фермента [5], не выявляемые использованными нами методами. Кроме того, в случае такого большого стерического заместителя, как использованный СМЕ-карбодимид, ингибирование активности может быть следствием блокирования несущественных для активности групп, расположенных в области активного центра или около него. Все вышесказанное отражает общие ограничения при использовании метода химической модификации [1, 2].

Для модифицированного фермента наблюдается возрастание величины K_m для низкомолекулярных субстратов, незначительное для триптофана и более существенное для АТР (табл. 2). Это хорошо согласуется с опытами по защитному действию субстратов. Таким образом, все полученные нами данные отвечают представлению, что карбоксильные группы фермента, существенные на стадии активации аминокислоты, вовлекаются в связывание низкомолекулярных субстратов, скорее всего АТР. Взаимодействие карбоксильной группы с АТР осуществляется, вероятно, через мостиковый ион цинка, как это было постулировано в работе [16].

тРНК^{Trp} дает только небольшой защитный эффект в отношении реакции аминоацилирования тРНК (рис. 4б). Вероятно, карбоксильные группы не участвуют в связывании этого субстрата. Это предположение находит подтверждение при сравнении величины K_m для тРНК у нативного и модифицированного СМЕ-карбодимидом фермента (табл. 2). Модифицируемые карбоксильные группы, существенные на постаденилатной стадии суммарной реакции аминоацилирования тРНК, по всей вероятности, участвуют в переносе активированного остатка триптофана с аминоациладенилата на тРНК^{Trp}. Аналогичный вывод был сделан применительно к фенилаланил-тРНК-синтетазе из *E. coli*, где наблюдалось снижение K_m (и K_s) для тРНК параллельно с подавлением аминоацилирующей активности фермента [18]. На каталитическую функцию существенных для аминоацилирования остатков указывает также полное подавление при их модификации аминоацилирующей активности фермента.

Порядок реакции по концентрации ингибитора для фермента, инактивированного в реакции аминокислотирования тРНК, равен 1,8 (рис. 5). Это позволяет предполагать, что за инактивацию ответственны два карбоксильных остатка на молекулу [24].

Таким образом, полученные результаты согласуются с представлением, что модифицируемые СМЕ-карбодимидом карбоксильные группы триптофанил-тРНК-синтазы участвуют в связывании низкомолекулярных лигандов (в первую очередь АТР) и в переносе активированного остатка триптофана на тРНК. Модификация, вероятно, подвергается тот остаток дикарбоновой кислоты, который вовлекается в образование триптофанилфермента [7] и с которого активированный остаток триптофана переносится на тРНК [6].

Авторы глубоко признательны Л. Л. Киселеву за постоянный интерес к работе и полезные советы, О. И. Лаврик (НИОХ СО АН СССР) за предоставление препаратов СМЕ-карбодимидов и И. А. Болотиной за снятие спектров КД.

Экспериментальная часть

В работе использовали *L*-[¹⁴C-метил]триптофан (52 Ки/моль) и [³²P]пирофосфат (122 Ки/моль) (Amersham, Англия); динатриевую соль АТР, трис (Reanal, Венгрия); 3-(*N*-морфолино)пропансульфокислоту (MOPS), додецилсульфат натрия, кумасси бриллиантовый голубой G-250 и R-250, набор белков-маркеров MS-II (Serva, Швеция); *L*-триптофан и активированный уголь Норит А (Sigma, США); бромид цетилтриметиламмония (цетавлон), нитроцеллюлозные фильтры диаметром 24 мм «Синпор» № 2 и 3 (Chemapol, ЧССР); сефадекс G-50, тонкий (Pharmacia, Швеция).

СМЕ-карбодимид и [¹⁴C]СМЕ-карбодимид (уд. акт. 7,6 Ки/моль) синтезирован в НИОХ СО АН СССР как описано в работе [18].

Дрожжевая тРНК^{Trp}, содержащая 2% тРНК^{Trp}, получена В. Ш. Шейнкером (ИМБ АН СССР) после фракционирования [25] суммарной дрожжевой тРНК и использована для определения активности. В опытах по защитному действию субстратов использовали 70% дрожжевую тРНК, любезно предоставленную д-ром Ж. Кайтом (Франция).

Препарат фермента получали по методике, описанной ранее [22]. Препарат гомогенен при электрофорезе в денатурирующих условиях. Активность фермента в реакции АТР — [³²P]пирофосфатного обмена и аминокислотирования тРНК определяли согласно работе [5]. Радиоактивность просчитывали в толуольном сцинтиллаторе на счетчике SL-40 (Intertech-nique, Франция).

Модификацию триптофанил-тРНК-синтазы СМЕ-карбодимидом проводили в 100 мМ MOPS-КОН-буфере при различных значениях pH (5,5; 6,1 и 6,8) при 25° С. Реакционная смесь в объеме 100 мкл содержала: 100 мМ MOPS, 8 мкМ фермент, СМЕ-карбодимид в концентрации от 0 до 14 мМ (добавляли во всех случаях последним).

Для получения кинетической кривой инактивации (рис. 1, 3) в указанное время отбирали аликвоты по 2 мкл, разводили в 100 и в 5 раз раствором 0,4% желатина в 0,01 М трис-НСl-буфере, pH 7,5, и использовали по 5 мкл для определения активности в реакциях аминокислотирования тРНК и АТР-[³²P]пирофосфатного обмена соответственно.

Для определения числа модифицированных групп фермент инкубировали 3 ч с 2,0 мМ [¹⁴C]СМЕ-карбодимидом при pH 5,5 и удаляли избыток реагента диализом против 0,1 М трис-НСl-буфера, pH 7,5. Одновременно в образце определяли глубину инактивации фермента. Остаточную активность модифицированного фермента определяли, если не оговорено особо, в реакции аминокислотирования тРНК.

Для реактивации триптофанил-тРНК-синтазы к пробе, содержащей модифицированный фермент, добавляли 1/2 объема 2 М трис-НСl-буфера, pH 9,0, и инкубировали 30 мин при 25° С. Затем пробы подвергали гель-фильтрации на колонке с сефадексом G-50 (тонкий, объем 1,8 мл), уравновешенной 0,1 М трис-НСl-буфером, pH 7,5. Белок собирали по поглоще-

нию при 280 нм (объем ~0,5 мл) и определяли активность. Аналогично обрабатывали немодифицированный белок. Электрофорез препаратов фермента в денатурирующих условиях проводили так, как описано в работе [26].

Гель-хроматографии подвергали препараты триптофанил-тРНК-синтетазы, полностью модифицированной 14 мМ СМЕ-карбодимидом при pH 5,5 в течение 1 ч. На колонку с сефадексом G-200 (0,8×40 см), уравновешенным 0,1 М трис-НСl, pH 7,5, наносили 400 мкл 40 мкМ модифицированного фермента. Скорость элюции 2 мл/ч, объем фракций 0,2 мл. Аналогичным образом проводили гель-хроматографию нативного фермента и белков-маркеров (каталаза (240), альдолаза (143), бычий сывороточный альбумин (67), овальбумин (45), трипсин (23,3), цитохром с (13,4) — в скобках указан $M \cdot 10^{-3}$).

Спектры КД. Фермент обрабатывали 3 ч 2,2 мМ СМЕ-карбодимидом при pH 5,5 (остаточная активность 36%), избыток реагента удаляли диализом против 20 мМ трис-НСl-буфера, pH 7,5, и измеряли спектры в ближней и дальней УФ-области на дихрографе «Jobin-Ivon Mark V». В дальней УФ-области (200–250 нм) измерения проводили при концентрациях белка ~0,5 мг/мл в кюветках с длиной оптического пути 0,5 мм при чувствительности прибора $5 \cdot 10^{-6}$ ОЕ/мм с постоянной времени 5 с и скоростью сканирования 0,1 нм/с. В ближней УФ-области (250–340 нм) измерения проводили при концентрации белка ~1,5 мг/мл в кюветках с длиной оптического пути 1 см при чувствительности прибора $2 \cdot 10^{-6}$ ОЕ/мм, постоянной времени 10 с и скорости сканирования 0,1 нм/с.

ЛИТЕРАТУРА

1. Means G. E., Feeney R. E. Chemical modification of proteins. San Francisco: Holden-Day, 1971, p. 144.
2. Северин Е. С., Курочкин С. Н., Кочетков С. П. В кн.: Успехи биологической химии. М.: Наука, 1974, т. 15, с. 65–85.
3. Iborra F., Mourgeon G., Labouesse B., Labouesse J. Eur. J. Biochem., 1973, v. 39, № 2, p. 547–556.
4. Iborra F., Labouesse B., Labouesse J. J. Biol. Chem., 1975, v. 250, № 17, p. 6659–6665.
5. Favorova O. O., Madoyan I. A., Kisselev L. L. Eur. J. Biochem., 1978, v. 86, № 1, p. 193–202.
6. Фаворова О. О., Ковалева Г. К., Мороз С. Г., Киселев Л. Л. Молекулярн. биология, 1978, т. 12, № 3, с. 588–601.
7. Kovaleva G. K., Moroz S. G., Favorova O. O., Kisselev L. L. FEBS Lett., 1978, v. 95, № 1, p. 81–84.
8. Sellini H., Maurizot J. C., Dimicoli J. L., Hélène C. FEBS Lett., 1973, v. 30, № 2, p. 219–224.
9. Laucelot G., Hélène C. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977, v. 74, № 11, p. 4872–4875.
10. Bruskov V. I. Stud. Biophys., 1978, v. 67, № 1, p. 43–44.
11. Hélène C. FEBS Lett., 1977, v. 74, № 1, p. 10–13.
12. Фаворова О. О., Парин А. В., Лаврик О. И. В кн.: Биофизика. М.: ВИНТИ, 1972, т. 2, с. 6–100.
13. Holler E., Rainey P., Orme A., Bennet E. L., Calvin M. Biochemistry, 1973, v. 12, № 6, p. 1150–1159.
14. Hélène C. Nucl. Acids Res., 1975, v. 2, № 6, p. 961–969.
15. Weiner L. M., Backer J. M., Rezvukhin A. I. Biochim. et biophys. acta, 1975, v. 383, № 3, p. 316–324.
16. Нурбеков М. К., Фаворова О. О., Дмитриенко С. Г., Болотина Ш. А., Киселев Л. Л. Молекулярн. биология, 1981, т. 15, № 5, с. 1000–1010.
17. Carraway K. L., Koshland D. E. In: Methods Enzymol., v. 25, part B/Eds Hirs C. H. W., Timasheff S. N. N. Y.: Acad. Press, 1972, p. 616–623.
18. Горшкова И. И., Лаврик О. И., Филиппов В. В. Молекулярн. биология, 1981, т. 15, № 1, с. 62–71.
19. Timkovich R. Analyt. Biochem., 1977, v. 79, № 1, p. 135–143.
20. Kurzer F., Douraghi-Zadeh K. Chem. Rev., 1967, v. 67, № 2, p. 107–152.
21. Timkovich R. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1977, v. 74, № 4, p. 1463–1468.
22. Kisselev L. L., Favorova O. O., Kovaleva G. K. In: Methods Enzymol., v. 59, part G/Eds Moldave K., Grossman L. N. Y.: Acad. Press, 1979, p. 234–257.
23. Lemaire G., Gros C., Epely L., Kaminski M., Labouesse B. Eur. J. Biochem., 1975, v. 51, № 1, p. 237–252.
24. Levy H. M., Leber P. D., Ryan E. M. J. Biol. Chem., 1963, v. 238, № 11, p. 3654–3659.
25. Roy K. L., Söll D. Biochim. et biophys. acta, 1968, v. 161, № 2, p. 572–574.
26. Weber K., Osborn M. J. Biol. Chem., 1969, v. 244, № 16, p. 4406–4412.

Поступила в редакцию
8.VII.1981

ESSENTIAL CARBOXYLIC GROUPS IN BOVINE TRYPTOPHANYL-tRNA SYNTHETASE

NURBEKOV M. K., SUDAKOVA E. S., FAVOROVA O. O.

Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

Modification of carboxylic groups of bovine tryptophanyl-tRNA synthetase with water-soluble carbodiimide leads to the enzyme inactivation at a rate depending on the concentration of the modifying reagent and pH. The enzyme inactivated at pH 5,5 restores its activity practically completely after alkaline treatment at pH 9,0 and contains at most 15% of the intramolecular cross-links. 50% inactivation is reached after incorporation of approximately 4 moles [¹⁴C]carbodiimide per mole of dimeric enzyme. CD spectra of the native and modified proteins are very similar. The modified enzyme retains its dimeric structure. The loss of aminoacylating capacity is characterized by the pseudo-first order rate constant and amounts to 100%. The ATP-pyrophosphate exchange activity initially follows the same kinetics but later on approaches the plateau. The reaction order with respect to the inhibitor concentration is 1,8 for aminoacylation activity of the enzyme, that suggests the involvement of two carboxylic groups. The protective action of substrates and changes in K_m values upon modification are consistent with the idea that the modified carboxylic groups participate in binding of low-molecular weight substrates – primarily, ATP and in catalysis of the transfer of tryptophanyl residue from adenylate to tRNA^{Trp}.