



УДК 577.152.611*20'134

ИССЛЕДОВАНИЕ ТОПОГРАФИИ АКТИВНЫХ ЦЕНТРОВ ФЕНИЛАЛАНИЛ-тРНК — СИНТЕТАЗЫ ИЗ *E. coli* MRE-600 С ПОМОЩЬЮ АНАЛОГОВ АТР, ПРОИЗВОДНЫХ ПОЛИМЕТИЛЕНДИАМИНОВ

Невинский Г. А., Зыков С. А., Лаврик О. И.

Новосибирский институт органической химии
Сибирского отделения Академии наук СССР

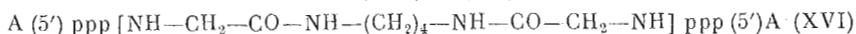
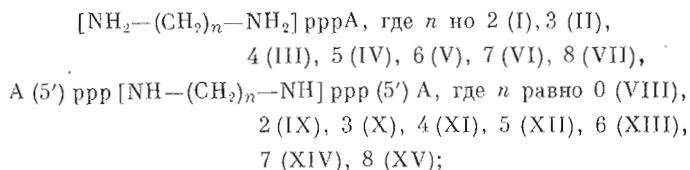
Исследовано взаимодействие монофункциональных производных АТР структуры $[\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_n]\text{pppA}$ ($n=2-8$) и бифункциональных аналогов АТР структуры $\text{A}(5')\text{ppp}[\text{NH}-(\text{CH}_2)_n-\text{NH}]\text{ppp}(5')\text{A}$ ($n=0,2-8$), а также $\text{A}(5')\text{ppp}[\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{NH}]\text{ppp}(5')\text{A}$ с фенилаланил-тРНК-синтетазой из *E. coli* MRE-600. Показано, что все монофункциональные аналоги АТР являются смешанными ингибиторами по отношению к АТР и имеют близкие величины констант ингибирования (0,6–1 мМ). Все бифункциональные аналоги АТР проявляют конкурентный по отношению к АТР тип ингибирования, и их сродство к ферменту в 2–9 раз выше, чем у АТР. Максимальное сродство к синтетазе имеют бис-АТР-производные октаметиленамина и N,N'-бис-(аминоацетил)тетраметиленамина (K_1 23–26 мкМ). Высказано предположение, что расстояние между центрами связывания АТР с функциональным димером синтетазы близко к 28–30 Å.

Аминоацил-тРНК-синтетазы разной специфичности и из различных источников имеют разную субъединичную структуру (α , α_2 , $\alpha\beta$, α_1 , $\alpha_2\beta_2$) [1]. Поскольку большинство из них — функциональные димеры, возник вопрос о роли взаимодействия двух активных центров для катализа и специфичности этой группы ферментов.

Одним из наиболее информативных методов исследования структуры ферментов является метод рентгеноструктурного анализа. В настоящее время удалось закристаллизовать только несколько аминоацил-тРНК-синтетаз [1–3]. Поэтому применение метода рентгеноструктурного анализа к исследованию синтетаз ограничено. Кроме того, структура ферментов в кристаллах и растворе может различаться [3]. В связи с этим для понимания механизмов катализа необходимо сравнение данных, полученных для ферментов в кристаллах и растворе.

В работе [3] с помощью метода рентгеноструктурного анализа для тирозил-тРНК-синтетазы из *B. stearothermophilus* было оценено расстояние между «нуклеотидными складками» функционального димера — 30 Å (структура фермента α_2). Для проведения подобных измерений в растворе представляется перспективным использовать бифункциональные производные АТР и аминокислот, где две молекулы субстрата связаны «мостиками» различной длины. Такие аналоги также могут позволить выявить кооперативность в связывании субстратов.

Ранее в работе [4] нами был описан синтез аналогов АТР:



В данной работе изучено взаимодействие этих соединений с фенилаланил-тРНК-синтетазой структуры $\alpha_2\beta_2$.

Таблица 1

Ингибирование реакции аминоацилирования тРНК, катализируемой фенилаланил-тРНК-синтетазой, монофункциональными аналогами АТР

Число метиленовых звеньев в аналоге (соединение)	K_i , мМ*	K_i/K_m
2 (I)	0,61	2,8
3 (II)	0,85	3,9
4 (III)	0,96	4,4
5 (IV)	0,76	3,5
6 (V)	0,74	3,4
7 (VI)	0,7	3,2
8 (VII)	0,71	3,2

* Определяли ингибирование по отношению к АТР. Для расчета использовали 4–6 величин констант. Ошибка определения отношения K_i/K_m не превышала 10–15%.

Таблица 2

Ингибирование реакции аминоацилирования тРНК, катализируемой фенилаланил-тРНК-синтетазой, бифункциональными аналогами АТР

Число метиленовых звеньев в аналоге (соединение)	K_i , мМ*	K_i/K_m
0 (VIII)	0,136	0,61
2 (IX)	0,124	0,56
3 (X)	0,076	0,34
4 (XI)	0,056	0,25
5 (XII)	0,088	0,40
6 (XIII)	0,078	0,35
7 (XIV)	0,104	0,47
8 (XV)	0,026	0,12
(XVI)	0,024	0,11

* Определяли ингибирование по отношению к АТР. Для расчета использовали 4–6 величин констант. Ошибка определения отношения K_i/K_m не превышала 10–15%.

Учитывая возможность влияния длины «мостика» на сродство аналогов АТР к ферменту, сначала исследовали взаимодействие с синтетазой монофункциональных производных (I)–(VII).

Было показано, что соединения (I)–(VII) не проявляют субстратных свойств. Это согласуется с отсутствием субстратных свойств у γ -анилидов АТР в случае фенилаланил-тРНК-синтетазы [5–6]. Из рис. 1 видно, что (5-аминопентил)- γ -амид АТР проявляет смешанный по отношению к АТР тип ингибирования. Аналогичный результат получен при исследовании других монофункциональных аналогов АТР – производных полиметиленадиаминов (I)–(VII). Величины констант ингибирования для этих соединений приведены в табл. 1.

Как видно из табл. 1, какой-либо отчетливо выраженной зависимости величин K_i от длины углеводородного радикала при γ -фосфате АТР нет. Небольшое уменьшение сродства к ферменту аналогов (I)–(VII) по сравнению с АТР согласуется с результатами, полученными для других производных АТР, модифицированных по γ -фосфату [6].

При нейтральных значениях pH свободная аминогруппа в аминокислотах γ -амидах АТР (I)–(VII) протонирована и способна образовывать внутренние соли с остатками фосфата АТР [4]. В результате эффективный отрицательный заряд молекул аналогов уменьшается на единицу, и в определенном приближении эти соединения можно рассматривать как аналоги ADP. Известно, что β -амиды ADP взаимодействуют с аминокислот-тРНК-синтетазами, проявляя смешанный по отношению к АТР тип ингибирования, причем ингибирование наблюдается только при достаточно высоких концентрациях аналогов (>1 мМ). В случае производных АТР, эффективно взаимодействующих с синтетазами в концентрациях 0,01–0,5 мМ, обычно наблюдается конкурентный по отношению к АТР тип ингибирования [5–7]. Проявление смешанного по отношению к АТР типа ингибирования при высоких концентрациях нуклеотидов, как было показано в работах [5–7], скорее всего связано с их взаимодействием не только с АТР-связывающими участками каталитического центра синтетаз, но и с эффекторными нуклеотидсвязывающими участками этих ферментов [5–7]. Смешанный тип ингибирования, проявляемый монофункциональными аналогами АТР (I)–(VII), по-видимому, также обусловлен их взаимодействием с двумя типами нуклеотидсвязывающих участков фенилаланил-тРНК-синтетазы. Близкие величины K_i для всех исследованных моноамидов АТР (табл. 1) в целом могут указывать на несущественное значение длины радикала при γ -фосфате АТР для образования комплекса с ферментом.

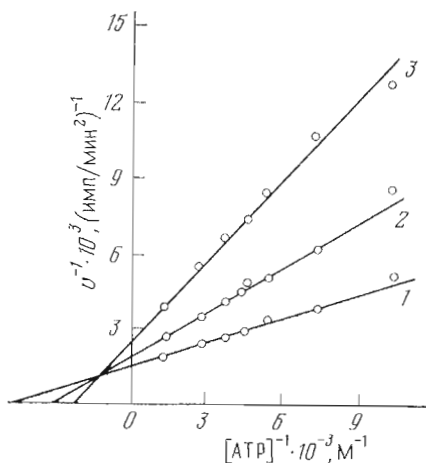


Рис. 1

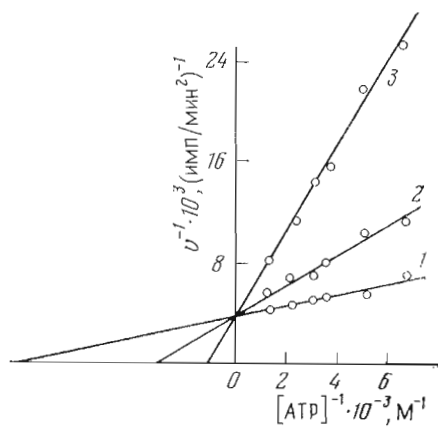


Рис. 2

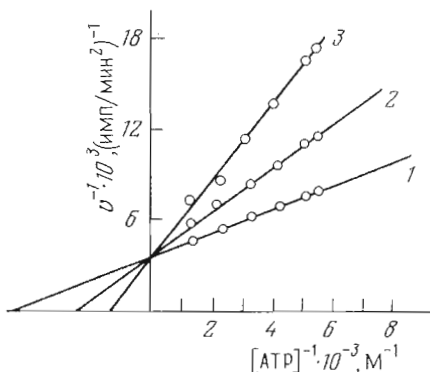


Рис. 3

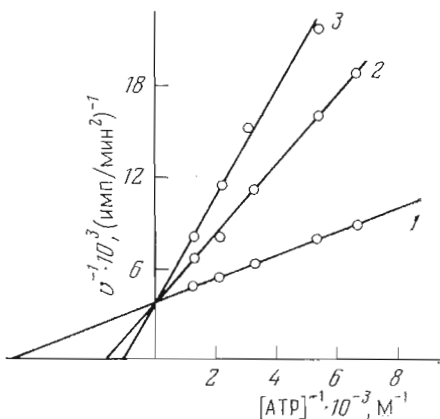


Рис. 4

Рис. 1. Зависимость начальной скорости реакции аминоацилирования тРНК^{Phe} от концентрации АТР в отсутствие (1) и в присутствии 0,9 мМ (2) и 1,5 мМ (3) (5-аминопентил)-γ-амида АТР (IV) в обратных координатах

Рис. 2. Зависимость начальной скорости реакции аминоацилирования тРНК^{Phe} от концентрации АТР в отсутствие (1) и в присутствии 0,17 мМ (2) и 5,3 мМ (3) производного тетраметилендиамина (XI) в обратных координатах

Рис. 3. Зависимость начальной скорости реакции аминоацилирования тРНК^{Phe} от концентрации АТР в отсутствие (1) и в присутствии 0,047 мМ (2) и 0,13 мМ (3) производного октаметилендиамина (XV) в обратных координатах

Рис. 4. Зависимость начальной скорости реакции аминоацилирования тРНК^{Phe} от концентрации АТР в отсутствие (1) и в присутствии 0,043 мМ (2) и 0,084 мМ (3) производного NN'-бис-(аминоацетил)тетраметилендиамина (XVI) в обратных координатах

При исследовании взаимодействия фенилаланил-тРНК-синтетазы с бифункциональными аналогами АТР (VIII)–(XVI) было показано, что эти соединения, так же как и монофункциональные аналоги АТР, не обладают субстратными свойствами в реакции аминоацилирования тРНК. Оказалось, что все производные этого типа проявляют конкурентный по отношению к АТР характер ингибирования и имеют высокое сродство к ферменту (рис. 2–4, табл. 2). Сродство к ферменту аналогов (VIII)–(XVI) примерно в 2–9 раз выше сродства АТР и в 7–40 раз выше сродства монофункциональных аналогов АТР (табл. 2). В связи с этим не кажется удивительным, что бифункциональные аналоги АТР проявляют конкурентный по отношению к АТР тип ингибирования по сравнению со смешанным ингибированием в случае монофункциональных аналогов (I)–(VII). Заметный вклад в ингибирование за счет взаимодействия

нуклеотидов с эффекторными центрами наблюдается при высоких концентрациях лигандов (~ 1 мМ) [5–7], в то время как бис-АТР-производные полиметилендиаминов эффективно ингибируют реакцию аминиацелирования тРНК при концентрациях 0,01–0,1 мМ.

Увеличение средства бифункциональных аналогов АТР (примерно в 2 раза) можно ожидать, поскольку вероятность взаимодействия бифункционального аналога с одним из центров функционального димера выше из-за удвоенного количества остатков АТР в таких соединениях [8]. По-видимому, с этим фактором связано в 2 раза большее по сравнению с АТР средство аналогов (VIII), (IX) и (XII)–(XIV). В целом изменение величин K_1 в зависимости от длины «мостика» между двумя молекулами АТР имеет два выраженных минимума (табл. 2), соответствующих аналогам, содержащим 4 и 8 метиленовых звеньев.

Бис-АТР-производным полиметилендиаминам с линейной структурой мостиков между остатками двух аденозинов в аналогах будут соответствовать максимально возможные расстояния между двумя нуклеозидами, которые уменьшаются в случае изогнутой конформации «мостиков». С помощью данных о длине и углах связей [9] мы оценили диапазон длин мостиков линейной структуры всего ряда синтезированных нами бифункциональных аналогов АТР между 5'-атомами кислорода остатков двух аденозинов от 15 до 32 Å. При переходе от одного аналога к другому размер линейного мостика увеличивается примерно на 1–2 Å.

Учитывая, что фенилаланил-тРНК-синтетаза из *E. coli* имеет четыре центра связывания для нуклеотидов — два эффекторных и два каталитических участка [5–7], мы полагаем, что первый минимум в величинах K_1 может быть связан с попаданием одного из остатков АТР в АТР-связывающий участок каталитического центра фермента (что обеспечивает конкурентный характер ингибирования), а второго остатка АТР — в эффекторный центр синтетазы. Не исключена также возможность попадания второго остатка АТР в составе бифункционального аналога АТР в какой-либо участок на молекуле фермента с неопределенной функцией [6] или, что менее вероятно, в участок для связывания концевой аденозина в составе тРНК [10]. Предполагая, что остатки аденозина аналога АТР попадут в эти два участка, как только максимально возможный размер «мостика» между остатками аденозина в составе аналога станет равным расстоянию между такого рода центрами, мы оценили это расстояние в 22–24 Å.

Второе, наиболее выраженное понижение в величинах K_1 (одинаковое в случае бис-АТР-производных октаметилендиамина и N,N' -бис(аминоацетил)тетраметилендиамина) скорее всего связано с одновременным взаимодействием этих аналогов АТР с двумя АТР-связывающими участками каталитических центров фермента. В пользу такого предположения говорит также конкурентный по отношению к АТР тип ингибирования и высокое средство бис-АТР-производного октаметилендиамина в реакции АТР — $[^{32}\text{P}]$ пирофосфатного обмена, катализируемой фенилаланил-тРНК-синтетазой (рис. 5). В данной реакции исключена возможность

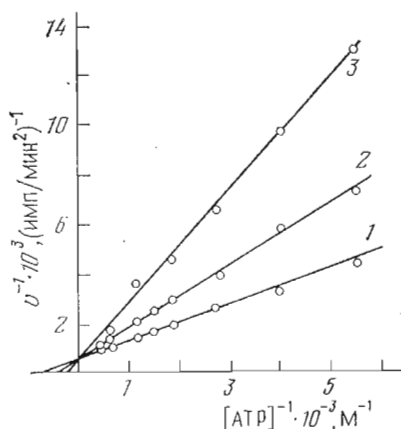


Рис. 5. Зависимость начальной скорости реакции обмена АТР — $[^{32}\text{P}]$ пирофосфат от концентрации АТР в отсутствие (1) и в присутствии 0,15 мМ (2) и 0,31 мМ (3) производного октаметилендиамина (XV) в обратных координатах. Величина K_m для АТР найдена с помощью реакции обмена равной 1,5 мМ, а величина K_1 для соединения (XV) 0,12 мМ. Отношение K_m/K_1 больше 12

ингибирования катализа реакции аналогом за счет взаимодействия бис-АТР-производного диамина с тРНК-связывающим участком фермента.

Учитывая указанное выше допущение о возможности взаимодействия фермента с бис-АТР-производными полиметиленаминами, когда последние имеют минимально изогнутую конформацию мостика между остатками аденозина, расстояние между АТР-связывающими участками активных центров фенилаланил-тРНК-синтетазы оценено близким к 28–30 Å. Этот результат согласуется с данными о расстоянии между нуклеотидными складками тирозил-тРНК-синтетазы (30 Å), найденном с помощью метода рентгеноструктурного анализа [3]. Это особенно интересно, поскольку ферменты имеют разную субъединичную структуру (α_2 – тирозил-, $\alpha_2\beta_2$ – фенилаланил-тРНК-синтетаза).

В работе [11] показано, что диаметр отдельной субъединицы синтетазы, специфичной к тирозину, приблизительно равен 60 Å. Диаметры отдельных субъединиц других аминокислот-тРНК-синтетаз можно оценить равными 40–90 Å. Расстояние между активными центрами, равное 30–40 Å для олигомерных синтетаз, хорошо согласуется с предположением о расположении активных центров в области контакта отдельных субъединиц.

Для фенилаланил-тРНК-синтетазы из *E. coli* в работах [12–15] показано, что центр фермента, связывающий аминокислоту, расположен на малой α -субъединице, а тРНК-связывающий центр – на большой β -субъединице фермента. Акцепторный конец тРНК скорее всего локализован вблизи контакта субъединиц [14]. Данных, указывающих на возможность расположения активных центров в области контакта субъединиц, в случае других олигомерных синтетаз существенно меньше. Однако на возможность расположения центров функциональных димеров в области контакта субъединиц могут указывать несколько экспериментальных фактов. Так, отдельные субъединицы олигомерных синтетаз каталитически неактивны [1–2]. В последнее время предполагается, что для ферментов, имеющих одну полипептидную цепь, для катализа необходимо образование димерной формы, происходящее в присутствии тРНК [16].

Ранее с помощью аналогов типа $A(5')pp(5')A - A(5')pppp(5')A$ было установлено расстояние между АТР- и АМР-связывающими участками аденилаткиназы из мышц кролика [17] и показано, что последний бифункциональный аналог АТР имеет сродство почти на два порядка выше, чем АТР и другие аналоги. В нашем случае наблюдается максимальное увеличение сродства на порядок. Это, по-видимому, объясняется тем, что АТР-связывающие центры фенилаланил-тРНК-синтетазы из *E. coli* проявляют небольшую отрицательную кооперативность. Так, в работе [6] показано, что аффинная модификация одного из АТР-связывающих центров приводит к уменьшению сродства АТР к свободному центру в 2–3 раза. Увеличение сродства, возможно, также связано с наличием у бис-АТР-производных полиметиленаминов большого числа конформаций с изогнутой полиметиленовой цепью между двумя остатками нуклеотида, что может приводить к уменьшению эффективной концентрации бис-АТР-производного, способного взаимодействовать одновременно с двумя нуклеотидсвязывающими центрами фермента.

Экспериментальная часть

Фенилаланил-тРНК-синтетазу из *E. coli* MRE-600 (КФ 6.1.1.20) очищали согласно работе [18] с некоторыми модификациями. Использовали препараты 75–80% чистоты по данным электрофореза в полиакриламидном геле. Удельная активность препаратов 300–400 нмоль [^{14}C] фенилаланина в 1 мин на 1 мг белка. Суммарный препарат тРНК, полученный из *E. coli* MRE-600 согласно [19], содержал 2–2,5% тРНК^{Phe} по акцепторной активности. В работе использовали [^{14}C] фенилаланин (300 Кп/ммоль; UVVVR, СССР), АТР (Reanal, Венгрия), бычий сывороточный альбумин (Koch-Light, Англия), остальные реагенты были квалификации ос. ч.

Реакцию аминокислотирования тРНК проводили согласно [5]. Инкубационная смесь объемом 0,2–1 мл содержала 2,5 мМ $MgCl_2$, 50 мМ

трис-НСI-буфер (рН 8), 0,25 мкг/мл бычьего сывороточного альбумина, 1–2 мг/мл тРНК, 0,1–2 мМ АТР, 0,01 мМ [¹⁴С]фенилаланин. Реакцию запускали добавлением фермента до концентрации 1–1,5 мкг/мл. При исследовании субстратных свойств аналогов АТР (I)–(XVI) реакционная смесь вместо АТР содержала 0,1–10 мМ моно- или диамид АТР. При исследовании ингибиторных свойств аналогов их добавляли в реакционные смеси в концентрации 0,01–3,0 мМ. Аликвоты (20–70 мкл) реакционных смесей наносили на диски из бумаги FN-16 размером 2,5×2,5 см, пропитанные раствором 5% трихлоруксусной кислоты, и промывали при 4–5° С последовательно в четырех растворах 5% трихлоруксусной кислоты. Мишени сушили на воздухе и определяли их радиоактивность на счетчике Mark-III.

Реакцию обмена АТР — [³²Р]пирофосфат проводили согласно [5]. Реакционная смесь объемом 0,2 мл содержала 10 мМ MgCl₂, 50 мМ трис-НСI-буфер (рН 7,8), 100 мкг/мл бычьего сывороточного альбумина, 0,05 мМ фенилаланин, 0,1–5 мМ АТР, 2 мМ [³²Р]пирофосфат. Реакцию запускали добавлением 1–2 мкг/мл фермента и останавливали добавлением 5-кратного объема 5% трихлоруксусной кислоты, содержащей 1% активированного угля и 10 мМ пирофосфат. Смесь тщательно перемешивали и наносили на нитроцеллюлозные диски, которые промывали 5% трихлоруксусной кислотой. Затем на фильтр наносили 0,2 мл 2% раствора поливинилового спирта. Диски сушили и определяли их радиоактивность в толуоловом сцинтилляторе на счетчике Mark-III. В случае исследования ингибиторных свойств аналогов в реакционную смесь добавляли аналоги АТР в концентрации 0,01–5 мМ.

Величины констант ингибирования определяли графически.

Авторы глубоко признательны С. Н. Ходыревой и В. Н. Анкиловой за получение препаратов фенилаланил-тРНК-синтетазы, Д. Г. Кнорре за постоянный интерес и внимание к работе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kisselev L. L., Favorova O. O. *Advances in enzymology*, 1974, v. 40, p. 141–238.
2. Igloi G. L., Cramer F. In: *Transfer RNA*/Ed. Altman S. Cambridge: MIT Press, 1978, p. 294–349.
3. Rubin D., Blow D. M. *J. Mol. Biol.*, 1981, v. 145, № 3, p. 489–500.
4. Добронравова О. В., Зыков С. А., Мустаев А. А., Невинский Г. А. *Биоорган. химия*, 1982, т. 8, № 10, с. 1349–1357.
5. Лаврик О. И., Невинский Г. А., Рязанкин И. А. *Молекулярн. биология*, 1979, т. 13, № 6, с. 1001–1011.
6. Невинский Г. А. Модификация аминоксил-тРНК-синтетаз химически активными аналогами нуклеотидов. Автореф. дис. ... канд. хим. наук. М.: МГУ, 1979.
7. Lavrik O. I., Nevinsky G. A. *FEBS Lett.*, 1980, v. 109, № 1, p. 13–17.
8. Byers L. D. *J. theor. Biol.*, 1978, v. 79, p. 501–512.
9. *Справочник химика*/Ред. Никольский Б. П. М.—Л.: Госхимиздат, 1962, с. 352–379.
10. Горшкова И. И., Дацый И. И., Лаврик О. И., Невинский Г. А. *Биохимия*, 1981, т. 46, № 4, с. 699–707.
11. Irwin M. J., Nyborg I., Reid B. R., Blow D. M. *J. Mol. Biol.*, 1976, v. 105, № 3, p. 577–587.
12. Лаврик О. И., Ходырева С. Н. *Биохимия*, 1979, т. 44, вып. 3, с. 570–571.
13. Власов В. В., Лаврик О. И., Мамаев С. В., Ходырева С. Н., Чижиков В. Е., Швалье А. Ф. *Молекулярн. биология*, 1980, т. 14, вып. 3, с. 531–538.
14. Безнедельная Н. И., Горшкова И. И., Лаврик О. И., Ходырева С. Н. *Биоорган. химия*, 1981, т. 7, № 6, с. 876–883.
15. Lavrik O. I., Moor N. A., Khodyreva S. N. *Mol. Biol. Reports.*, 1982, v. 8, p. 123–126.
16. Parfait R. *Eur. J. Biochem.*, 1973, v. 38, № 3, p. 572–580.
17. Lienhard G. E., Secemski I. I. *J. Biol. Chem.*, 1973, v. 248, № 3, p. 1121–1123.
18. Stulberg M. P. *J. Biol.*, 1967, v. 242, № 5, p. 651–682.
19. Сандагчиев Л. С., Старостина В. К., Стефанович Л. Е., Чуцаев В. М. *Молекулярн. биология*, 1967, т. 1, № 4, с. 463–466.

Поступила в редакцию
9.III.1982
После доработки
12.XI.1982

PHENYLALANYL-tRNA SYNTHETASE FROM *E. COLI* MRE-600 INVESTIGATION
OF ACTIVE CENTER TOPOGRAPHY
BY ATP POLYMETHYLENEDIAMINE DERIVATIVES

NEVINSKY G. A., ZYKOV S. A., LAVRIK O. I.

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

Interaction of monofunctional ATP derivatives, $[\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_n]\text{pppA}$ ($n=2-8$), and bifunctional ATP derivatives, $\text{A}(5')\text{ppp}[\text{NH}-(\text{CH}_2)_n-\text{NH}]\text{ppp}(5')\text{A}$ ($n=0$ or $2-8$) with phenylalanyl-tRNA synthetase from *E. coli* MRE-600 was investigated. The monofunctional ATP derivatives behave as mixed-type inhibitors with respect to ATP (K_1 values about 0,6–1,0 mM). All bifunctional ATP analogs manifest competitive inhibition towards ATP with the affinity 2–9 times higher than ATP. The highest affinity was observed for bis-ATP derivatives of octamethylenediamine and $\text{N,N}'$ -bis-(aminoacetyl)tetramethylenediamine (K_1 0,023–0,026 mM). From these data the distance between the ATP-binding sites of functional dimer may be assumed to be equal to 28–30 Å.