



УДК 577.152.273*2'434:577.112.4

СУЩЕСТВЕННЫЕ ДЛЯ АКТИВНОСТИ КАРБОКСИЛЬНЫЕ ГРУППЫ АКТИВНЫХ ЦЕНТРОВ М- И М'-СУБЪЕДИНИЦ КРЕАТИНКИНАЗЫ ИЗ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ КРОЛИКА

Невинский Г. А., Газарянц М. Г.*

Новосибирский институт биоорганической химии
Сибирского отделения Академии наук СССР;

*Институт экспериментальной биологии Академии наук АрмССР, Ереван

Исследовано влияние модификации креатинкиназы из скелетных мышц кролика по карбоксильным группам с помощью N-циклогексил-N'-β-(4-метилморфолиний)этилкарбодимид-*n*-толуидинсульфоната на ее активность. Скорость модификации М- и М'-субъединиц фермента зависит от концентрации реагента и присутствия ионов магния. Процессы описываются линейными зависимостями логарифмов активности от времени, что указывает на псевдопервый порядок реакций. Реагент инактивирует М- и М'-субъединицы фермента примерно с одинаковой скоростью (константы максимальных скоростей модификации ~0,17 мин⁻¹) и имеет близкие величины K_1 (0,17 М). Мягкий щелочной гидролиз (рН 9,2) модифицированного белка приводит к частичному (30–60%) восстановлению его активности, а добавление метилового эфира [¹⁴С]глицина — к необратимому включению метки в белок. Конкурентные по отношению к нуклеотидным субстратам (АМР и γ-(*n*-азидоавилд)АТР) ингибиторы креатинкиназы защищают фермент от инактивации реагентом, в то время как креатин и креатинфосфат не влияют на скорость модификации белка. На основании полученных данных сделано предположение о модификации карбоксильных групп остатков глутаминовой или аспарагиновой кислот активных центров М- и М'-субъединиц с образованием производных аденизомочевины и локализации этих групп в АТР-связывающих участках фермента или вблизи них.

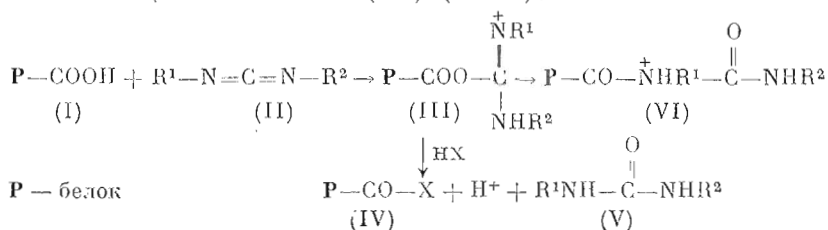
Креатинкиназа (АТР: креатин-N-фосфотрансфераза, КФ 2.7.3.2) катализирует обратимую реакцию переноса фосфорильного остатка с Mg^{2+} -АТР на креатин. Фермент состоит из двух функционально неидентичных субъединиц с примерно одинаковой молекулярной массой [1, 2]. В работах [1, 2] было достигнуто разделение субъединиц креатинкиназы на сорбенте с иммобилизованным аналогом АТР в условиях диссоциации димера. Показано, что одна из субъединиц катализирует прямую реакцию при рН 8,5–9,5, а обратную — при рН 7,5–8,0. Вторая субъединица проявляет максимальную активность в прямой реакции при рН 5,5–5,8, а в обратной — при рН 5,0 и меньше [1, 2]. В работах [1, 2] мы предложили называть первую субъединицу белка М-субъединицей, а вторую — М'-субъединицей.

С помощью метода химической модификации показано, что в активном центре креатинкиназы или вблизи него расположены остатки лизина, аргинина, тирозина и триптофана [3, 4]. Нами были предприняты попытки установления возможных различий в структурно-функциональной организации неидентичных субъединиц фермента. В работах [1, 2, 5–7] было показано, что фотоактивные аналоги АТР (εАТР и εАДР) модифицируют М- и М'-субъединицы киназы с различными скоростями. Аналогичное различие в скоростях модификации субъединиц было обнаружено при использовании в качестве аффинных реагентов γ-(N-(2-хлорэтил)-N-метил)амида АТР [8] и 2',3'-диальдегидных производных АДР и АТР [9], полученных окислением соответствующих нуклеотидов периодатом натрия. Первый реагент алкилировал имидазольные кольца остатков гистидина (рК 7,7), локализованных в участках связывания гуанидиневого группы креатина

Сокращения: СМЕ-карбодимид — *n*-толуидинсульфонат N-циклогексил-N'-β-(4-метилморфолиний)этилкарбодимида, Mops — 3-(N-морфолино)пропансульфокислота.

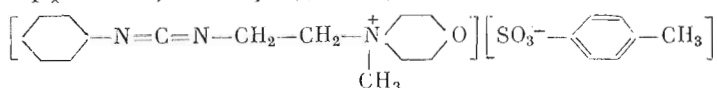
как М-, так и М'-субъединиц белка. С помощью диальдегидных производных нуклеотидов для обеих субъединиц было установлено наличие ε-аминогруппы остатков лизина вблизи рибофуранозилсвязывающих участков [9, 10]. В данной работе сделана попытка установления возможного различия между карбоксильными группами остатков глутаминовой или аспарагиновой кислот в активных центрах М- и М'-субъединиц креатинкиназы.

Метод химической модификации отдельных аминокислотных остатков фермента, особенно при отсутствии информации о его первичной и пространственной структуре, представляет собой ценный инструмент исследования их функциональной роли. Удобными реагентами для избирательной модификации протонированных карбоксильных групп аспарагиновой и глутаминовой кислот в белках являются водорастворимые карбодимиды, реакция с которыми протекает в мягких условиях [11, 12]. Согласно схеме Кошланда [11], реакция начинается с взаимодействия карбоксильной группы белка (I) с карбодимидом (II) по одной из двойных связей с образованием О-ацилизомочевины (III) (схема).



Активированная карбоксильная группа может реагировать двумя путями: 1) с нуклеофилом НХ, давая продукт присоединения нуклеофила по карбоксильной группе (IV) и мочевины (V); если нуклеофилом является вода (X=ОН), карбоксильная группа регенерируется; 2) изомеризоваться в устойчивую N-ацилмочевину (VI). Продукт (VI) содержит амидную связь; следовательно, обработка его в мягких условиях щелочью должна приводить к регенерации карбоксильной группы.

Для модификации креатинкиназы по карбоксильным группам мы выбрали широко используемый *n*-толуидинсульфонат N-циклогексил-N'-β-(4-метилморфолиний) этилкарбодимида:



Этот реагент ранее был успешно применен, например, для специфической модификации карбоксильных групп фенилаланил- [13] и триптофил-тРНК-синтетаз [14].

Инкубация креатинкиназы с СМЕ-карбодимидом приводила к инактивации как М-, так и М'-субъединицы белка. Модификацию фермента проводили в Морс/NaOH-буфере при рН 6,8. С понижением рН реакционной смеси скорость модификации белка возрастала. Однако при этом стабильность фермента снижалась, и в отсутствие карбодимида (контрольный опыт) наблюдалась его заметная инактивация. Скорость модификации креатинкиназы реагентом в отсутствие MgCl₂ приблизительно в 2–2,5 раза больше, чем в его присутствии. Однако, учитывая заметно большую стабильность киназы при добавлении соли магния в контрольном опыте (1,2–1,3 раза), дальнейшие эксперименты проводили в присутствии MgCl₂. При этом инактивация фермента в контрольных смесях (без карбодимида) при 25°С в течение 3–4 ч инкубации не превышала 10–15%.

Скорость и глубина инактивации отдельных М- и М'-субъединиц креатинкиназы возрастала при увеличении концентрации СМЕ-карбодимида. Зависимость логарифма остаточной активности от времени инкубации фермента в обоих случаях была линейной. Это указывало на псевдопервый порядок реакции модификации. Указанные зависимости были использованы для оценки кажущихся скоростей инактивации (*k*_{каж}) М- и М'-субъединиц фермента при фиксированных концентрациях СМЕ-карбодимида. С помощью данных рис. 1 были оценены величины констант

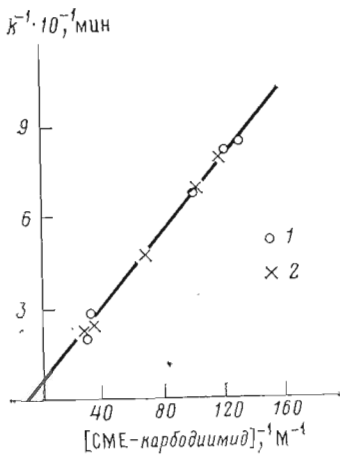


Рис. 1

Рис. 1. Зависимость величин k_{app} реакции инактивации М- (1) и М'- (2) субъединиц креатинкиназы от концентрации СМЕ-карбодимида

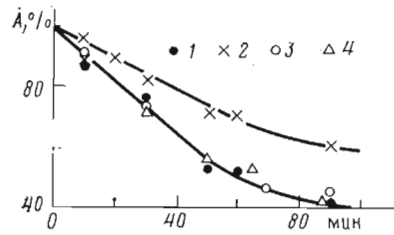


Рис. 2

Рис. 2. Кинетические кривые инактивации М- (1, 2) и М'- (3, 4) субъединиц креатинкиназы при 25°С 8 мМ СМЕ-карбодимидом в отсутствие (1, 3) и в присутствии (2, 4) 11 мМ АМР. Условия см. в «Экспер. части»

обратимого ингибирования М- и М'-субъединиц фермента ($\sim 0,17$ М для каждой из субъединиц) и константы максимальных скоростей их инактивации ($\sim 0,17$ мин $^{-1}$). Учитывая зависимость скорости модификации карбоксильных групп карбодимидом от степени их протонирования и практически одинаковые величины констант максимальных скоростей инактивации М- и М'-субъединиц белка, следует полагать, что в разных субъединицах фермента модифицируемые реагентом группы белка имеют близкие значения pK . Как было показано ранее [1, 2, 6, 7, 15], нуклеотиды и их аналоги проявляют различающуюся в 3–10 раз эффективность взаимодействия с неидентичными субъединицами креатинкиназы. В отличие от нуклеотидных лигандов СМЕ-карбодимид взаимодействует с М- и М'-субъединицами белка с одинаковой эффективностью.

Ранее [4, 16] на основании исследования зависимости киназной активности фермента от рН среды и результатов аффинной модификации креатинкиназы эпоксикреатином было сделано предположение о наличии в активном центре фермента карбоксильной группы и возможной ее локализации вблизи участка связывания гуанидиниевой группы креатина. В последней работе было показано, что креатин защищает фермент от инактивации эпоксикреатином. Однако в случае модификации субъединиц фермента СМЕ-карбодимидом добавление креатина или креатинфосфата в концентрациях, на 1–1,5 порядка превышающих величины K_m для этих субстратов, не приводило к заметному изменению скорости их инактивации. В то же время, как видно из рис. 2, конкурентный по отношению к нуклеотидным субстратам ингибитор фермента — АМР в концентрации, превышающей на порядок величину K_i для него, защищает киназу от инактивации. Следует отметить, что защитный эффект АМР в большей степени выражен по отношению к М-субъединице, чем к М'. Это согласуется с данными работ [1, 2], где показано, что при модификации креатинкиназы γ -(*n*-азидоанилидом) АТР АТР лучше защищает от инактивации М-субъединицу фермента.

Исследование защитных эффектов АDP и АТР в нашем случае не представлялось целесообразным, поскольку при взаимодействии этих соединений с СМЕ-карбодимидом образуются химически активные производные, которые сами инактивируют фермент. Нами было показано (данные не приведены), что образующийся при активации АТР адепозин-5'-триметафосфат инактивирует фермент с высокой скоростью даже при 0°С. В связи с этим мы исследовали защитный эффект аналога АТР — его

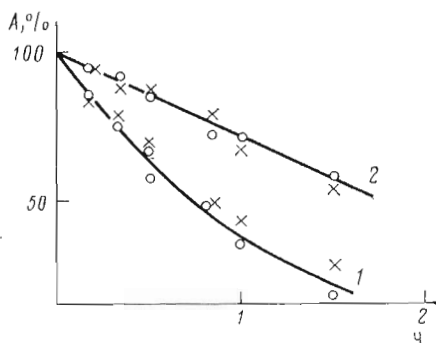


Рис. 3

Рис. 3. Кинетические кривые инактивации М- (О) и М'- (Х) субъединиц креатинкиназы при 25° С 8 мМ СМЕ-карбодимидом в отсутствие (1) и в присутствии (2) 6 мМ γ -(*n*-азидоанилида) АТР

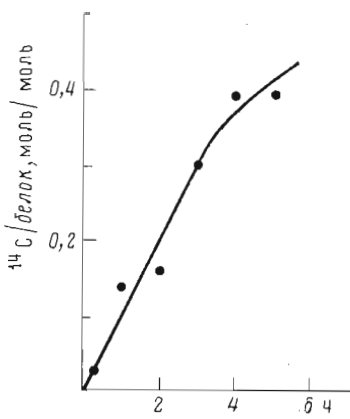


Рис. 4

Рис. 4. Кинетические кривые необратимого включения метилового эфира [^{14}C]глицина в инактивированную (на 95–100% по каждой из субъединиц) СМЕ-карбодимидом креатинкиназу. Условия см. в «Экспер. части» (вариант 2: предварительное удаление карбодимида гель-фильтрацией в присутствии додецилсульфата натрия)

γ -(*n*-азидоанилида). Этот аналог не взаимодействует с карбодимидом, но, как показано ранее [1, 2], является конкурентным по отношению к АТР ингибитором фермента. Как видно из рис. 3, этот аналог защищает обе субъединицы фермента от инактивации реагентом. Рассмотренные данные могут указывать на локализацию модифицируемых карбодимидом остатков аминокислот активных центров М- и М'-субъединиц креатинкиназы в нуклеотидсвязывающих участках фермента.

Для доказательства образования при модификации СМЕ-карбодимидом производного О-ацилизо мочевины типа (III) в инкубационную смесь одновременно с карбодимидом был добавлен метиловый эфир [^{14}C]глицина. Анализ радиоактивности в пике белка при гель-фильтрации реакционной смеси показал необратимое включение до 1 моль метилового эфира [^{14}C]глицина на 1 моль белка. Эти данные указывали на образование при модификации фермента карбодимидом химически активного производного карбоксильной группы фермента О-ацилизо мочевины. Однако стехиометрия включения метилового эфира [^{14}C]глицина не соответствовала глубине инактивации белка, которая в указанных экспериментах составляла >90–95%. Это могло быть связано с частичной пзомеризацией О-ацилизо мочевины в относительно устойчивую N-ацилмочевину (VI) или с взаимодействием активированной карбоксильной группы фермента со сближенными с ней нуклеофильными группами белка. Возможные внутримолекулярные реакции активированной карбоксильной группы со стерически сближенными группами белка можно было затормозить добавлением реагентов, нарушающих эту сближенность. С этой целью после достижения практически полной инактивации белка (остаточная активность <5%) реакцию модификации фермента останавливали добавлением додецилсульфата натрия (0,1%). Избыток СМЕ-карбодимида удаляли с помощью гель-фильтрации реакционной смеси на колонке, уравновешенной буфером, также содержащим 0,1% додецилсульфата натрия. На рис. 4 приведена кинетика включения метилового эфира [^{14}C]глицина в белок, полученный таким образом. Уровень включения составлял ~0,4 моль эфира [^{14}C]глицина на 1 моль белка, что примерно в 2,5 раза меньше, чем в первом случае. Это могло свидетельствовать в пользу предположения об изомеризации О-ацилизо мочевины в N-ацилмочевину (VI) или о взаимодействии активированной карбоксильной группы белка со сближенными с ней нуклеофильными группами активного центра с большей скоростью в отсутствие метилового эфира [^{14}C]глицина, чем в его присутствии.

Как было указано выше, продукт взаимодействия карбодимида с карбоксильной группой белка должен разрушаться в условиях мягкой щелочной обработки. Добавление Hepes/NaOH-буфера с pH 9,2 к модифицированному карбодимидом ферменту действительно приводило к восстановлению его активности. Однако степень реактивации зависела от времени инкубации белка с карбодимидом: она составляла 50–60% для образца, модифицированного в течение 1–1,5 ч, и снижалась до 30–40% для образца после 3–4 ч инкубации. Активность фермента в контрольных пробах (без карбодимида) за указанное время существенным образом не изменялась. Аналогичный результат был получен при сравнении активности препаратов модифицированной креатинкиназы после удаления низкомолекулярных лигандов гель-фильтрацией на колонке с сефадексом, уравновешенным буфером с pH 9,2. Фермент, инкубированный с СМЕ-карбодимидом в течение 1,5 ч (остаточная активность <math><5-10\%</math>), был подвергнут гель-фильтрации с использованием 0,05 М Mops/KOH-буфера с pH 6,8, содержащего $MgCl_2$. Последующая обработка аликвот раствора фермента Hepes/NaOH-буфером с pH 9,2 сразу после проведения процедуры гель-фильтрации, а также после выдерживания этих аликвот при 25°С в течение 1 и 3 ч приводила к восстановлению активности фермента соответственно на 60, 45 и 30%. Эти данные в совокупности с результатами по включению эфира [^{14}C]глицина в белок в различных условиях указывали на медленное протекание внутримолекулярных реакций между активированной карбоксильной группой и сближенными с ней нуклеофильными группами белка.

Хотя карбодимидные реагенты взаимодействуют преимущественно с карбоксильными группами, они могут также реагировать с гидроксильными группами тирозина, SH-группами цистеина [11, 16] и $\epsilon-NH_2$ -группами лизина. В отличие от N-ацилмочевины образующиеся в этих случаях продукты неспецифической модификации стабильны в мягких щелочных условиях [17]. Таким образом, невозможность полной реактивации модифицированного фермента позволяет заключить, что инактивацию фермента лишь частично можно объяснить модификацией карбоксильных групп. Инактивированная форма фермента, сохраняющаяся после щелочной обработки, может быть следствием как блокирования карбодимидом других групп белковой молекулы, так и образования меж- или внутрисубъединичных сшивок [18]. Экспериментальные данные свидетельствуют о большей вероятности последнего случая. В связи с этим следует отметить данные работы [19], где показано, что инкубация фермента с имидазолидами AMP, ADP и ATP приводит к инактивации фермента. При этом первоначально происходит активация карбоксильной группы путем образования смешанного ангидрида карбоновой и фосфорной кислот и ацилимидазола. Активированная карбоксильная группа модифицирует сближенную с ней OH-группу остатка тирозина с образованием ацилтирозина. Сложноэфирная связь, образованная карбоксильной и OH-группами активного центра фермента, не разрушается при обработке последнего щелочью в мягких условиях. Аналогичная реакция между активированной СМЕ-карбодимидом карбоксильной группой и OH-группой остатка тирозина могла протекать и в случае обработки фермента карбодимидом.

В работе [19] для установления образования ацилтирозина был использован разностный спектр нативного и обработанного имидазолидом нуклеотида препаратов фермента. Этот спектр соответствовал спектру N,O-диацетилтирозина. Сравнение спектров препаратов нативного и модифицированного СМЕ-карбодимидом фермента показало их небольшое отличие, качественно сходное с таковым в случае модификации фермента имидазолидами нуклеотидов. Однако изменение поглощения модифицированной креатинкиназы составляло не более 5–10% от того, которое было обнаружено при модификации фермента аналогами нуклеотидов. Таким образом, данные работы [19] свидетельствуют в пользу того, что образование ацилтирозина при обработке фермента СМЕ-карбодимидом может лишь частично объяснить неполное восстановление активности модифицированного белка при его обработке щелочью в мягких условиях.

Не исключено, что в активном центре фермента протекают реакции между активированной карбоксильной группой и другими, отличающимися от ОН-группы тирозина пуклеофилами, например ϵ -NH₂-группой остатка лизина и гуанидиниевой группой остатка аргинина, локализованных вблизи трифосфатсвязывающего участка активного центра фермента [19]. Не исключена также возможность прямой модификации СМЕ-карбодимидом SH-, ОН- и NH₂-групп соответствующих остатков аминокислот. Эти вопросы специально не исследовались.

Совокупность полученных данных свидетельствует в пользу локализации в пуклеотидсвязывающих центрах М- и М'-субъединиц киназы или вблизи них карбоксильных групп остатков глутаминовой или аспарагиновой кислот. Как было указано выше, в работах [4, 16] сделано предположение о локализации карбоксильных групп остатков кислых аминокислот вблизи участка связывания гуанидиниевой группы креатина. Отсутствие защитных эффектов креатина и креатинфосфата при модификации ферментом СМЕ-карбодимидом может указывать на то, что модифицируемые реагентом карбоксильные группы М- и М'-субъединиц не являются теми же самыми группами, которые постулированы ранее [4, 16]. В пользу этого предположения свидетельствуют также данные по модификации карбоксильных групп имидазолидами АМР, АДР и АТР [19].

Экспериментальная часть

В работе использовали препарат креатинкиназы из скелетных мышц кролика, полученный согласно [2], 95–99%-ной чистоты (по данным электрофореза в полиакриламидном геле) с уд. акт. 400 мэкв Н⁺/(мг/мин) [2]; АТР, АДР, АМР, креатин, креатинфосфат (Reanal, ВНР); Нерес, Мопс (Serva, ФРГ); сефадексы G-25, тонкий, и G-100, грубый (Pharmacia, Швеция); трис, дважды перекристаллизованный из воды (Олайн, СССР); СМЕ-карбодимид отечественного производства; [¹⁴C]глицин с уд. акт. 360 Ки/моль (Сметарол, СССР), остальные реактивы квалификации ос. ч. Синтез метилового эфира [¹⁴C]глицина проводили согласно работе [20] из [¹⁴C]глицина и абс. метилового спирта с помощью реакции этерификации. Продукт был гомогенным по данным ТСХ в системах ацетон – вода, 7 : 3; хлороформ – метанол, 9 : 1.

Активность креатинкиназы в обратной реакции измеряли в соответствии с работой [2]. Реакционная смесь объемом 0,1–0,2 мл содержала 5 мМ АДР, 10 мМ креатинфосфат, 10–15 мМ ацетат магния, 0,1 М буфер, 0,1–0,3 мкг/мл креатинкиназы. В случае исследования активности отдельных М- и М'-субъединиц фермента использовали соответственно Нерес/NaOH-буфер, рН 8,5, и натрий-ацетатный буфер; рН 5,0. После 1 мин инкубации смеси при 30° С реакцию останавливали добавлением 0,2 мл щелочной смеси (приготовлена согласно работе [1]), содержащей 1% α -нафтола, а затем 0,1 мл 2,5% раствора диацетила в воде [1,2]. Смесь разбавляли 2–6 мл воды. Количество образовавшегося креатина измеряли колориметрически при 520 нм.

Модификацию креатинкиназы и ее субъединиц СМЕ-карбодимидом проводили в течение 10–100 мин при 25° С в смеси объемом 0,2–2,0 мл, которая содержала 0,5–3,0 мг/мл фермента, 0,1 М Мопс/NaOH-буфер (рН 6,8), 0–50 мМ СМЕ-карбодимид, 10–15 мМ MgCl₂ (в некоторых случаях соль отсутствовала). В некоторых случаях время инкубации увеличивали до 2–4 ч. В экспериментах по защите фермента от инактивации субстратами и их аналогами добавляли 2–150 мМ креатин и креатинфосфат, 1–200 мМ АМР; 1–50 мМ γ -(*n*-азидоанилид) АТР.

Щелочной гидролиз продукта модификации фермента СМЕ-карбодимидом. *Вариант 1:* к аликвоте реакционной смеси (образцы с разным временем реакции модификации) или контрольной смеси, не содержащей реагента, добавляли 1/10 объема 2 М Нерес/NaOH-буфера, рН 9,2, и выдерживали смесь при 25° С в течение 1–4 ч. Изменение активности фермента во времени измеряли с помощью обратной реакции как описано выше. *Вариант 2:* избыток реагента отделяли от фермента с помощью гель-фильтрации. Для этого образцы с разным временем реакции модификации белка объемом 0,1 мл нанесли на колонку с сефадексом G-25 (тонкий), уравновешенным 0,1 М Нерес/NaOH-буфером (рН 9,2). Адсорбцию элюата при 280 нм регистрировали с помощью микроспектрофотометра «Милихром». В качестве контроля использовали препарат фермента, инкубиро-

ванный в аналогичных условиях в отсутствие карбодиимида и подвергнутый аналогичным процедурам. Сравнивали активность препаратов опыта и контроля до и после проведения гель-фильтрации. *Вариант 3*: фермент, модифицированный СМЕ-карбодиимидом (50 мМ, 1,5 ч), подвергали гель-фильтрации, как описано выше, с использованием 0,02 М Mops/NaOH-буфера (рН 6,8), содержащего 10 мМ MgCl₂. К аликвоте полученного раствора белка сразу после проведения гель-фильтрации, а также после выдерживания препаратов фермента при 25°С в течение 1 и 3 ч добавляли буфер с рН 9,2 и выдерживали как в варианте 1. Сравнение активности фермента с контрольным немодифицированным белком проводили как описано выше. Активность контрольных препаратов белка за время проведения описанных процедур уменьшалась не более чем на 10%. Восстановление активности модифицированного фермента при мягкой щелочной обработке зависело от времени его инкубации после гель-фильтрации и составляло 60, 45 и 30%.

Включение ¹⁴С-метки в белок. Вариант 1: в реакционную смесь для модификации фермента одновременно с СМЕ-карбодиимидом (50 мМ) добавляли метиловый эфир [¹⁴С]глицина в концентрации 25–50 мМ. В процессе инкубации смеси (до 5 ч) через каждые 30 мин аликвоты раствора подвергали гель-фильтрации для удаления избытка эфира так, как описано выше в случае восстановления активности фермента при мягкой щелочной обработке (вариант 2). В качестве контроля использовали фермент, инкубированный с метиловым эфиром [¹⁴С]глицина в отсутствие карбодиимида. *Вариант 2*: 2 мг белка (1 мл) модифицировали СМЕ-карбодиимидом (50 мМ) в течение 1,5 ч до достижения практически полной инактивации белка по каждой из субъединиц (95–100% инактивации). Затем препарат фермента подвергали гель-фильтрации на колонке объемом 10 мл с сефадексом G-25, уравновешенным 0,05 М Mops/NaOH-буфером, рН 6,8, содержащим 0,1% додецилсульфата натрия. К полученному раствору препарата фермента добавляли метиловый эфир [¹⁴С]глицина до конечной концентрации 30 мМ. Далее смесь инкубировали 1–5 ч при 25°С (как и в варианте 1), отбирая аликвоты смеси (0,1–0,2 мл) для повторной гель-фильтрации в условиях, аналогичных описанным выше для варианта 1 (колонка объемом 2 мл, буфер дополнительно содержащий 0,1% додецилсульфат натрия). Стехиометрию ковалентного связывания, как и в описанном выше случае, определяли по разности количества ¹⁴С-метки в пиках модифицированного белка и белка, инкубированного в отсутствие карбодиимида.

За изменением спектров креатинкиназы (25°С) при ее модификации карбодиимидом следили с помощью спектрофотометра Spexord M-40 (Carl Zeiss, Jena, ГДР) с программным управлением. Реакционная смесь содержала 2–4 мг/мл фермента и остальные реагенты, как описано выше. Разностные спектры модифицированного и нативного фермента снимали согласно [18].

Величины $k_{\text{нак}}$ инактивации киназы карбодиимидом при его фиксированных концентрациях, а также величины максимальных скоростей инактивации фермента реагентом были найдены графически по методу Китса–Вилсона согласно работе [21]. Ошибка в определении величин не превышала 30–40%.

Авторы глубоко признательны О. В. Халабуде за помощь в проведении некоторых экспериментов, О. И. Лаврик, Ж. И. Аюпяну, Д. Г. Кнорре — за постоянный интерес, полезные обсуждения и поддержку данной работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Nevinsky G. A., Ankilova V. N., Lavrik O. I., Mkrtchyan Z. S., Nersesova L. S., Аюпян И. И. FEBS Lett., 1982, v. 149, № 1, p. 36–40.
2. Невинский Г. А., Анкилова В. Н., Лаврик О. И., Мкртчян З. С., Нерсесова Л. С., Аюпян Ж. И. Биохимия, 1983, т. 48, вып. 2, с. 339–349.
3. Bickerstaff G. F., Price N. C. Int. J. Biochem., 1978, v. 9, № 1, p. 1–8.
4. Kenyon G. L., Reed G. H. Adv. in Enzymol. and Relat. Areas of Mol. Biol., 1983, v. 54, p. 367–426.
5. Невинский Г. А., Денисов А. Ю. Биооргани. химия, 1981, т. 7, № 11, с. 1693–1700.
6. Денисов А. Ю., Невинский Г. А., Лаврик О. И. Биохимия, 1982, т. 47, вып. 2, с. 184–190.

7. Денисов А. Ю., Невинский Г. А., Лаврик О. И. Биооргани. химия, 1982, т. 8, № 1, с. 72-79.
8. Невинский Г. А., Газарянц М. Г., Лаврик О. И. Биооргани. химия, 1984, т. 10, № 5, с. 656-665.
9. Невинский Г. А., Газарянц М. Г., Мкртчян Э. С. Биооргани. химия, 1983, т. 9, № 4, с. 487-495.
10. Невинский Г. А., Вгорушина И. А., Бульчев Н. В., Ковалева Г. К., Лаврик О. И. Молекулярн. биология, 1985, т. 19, вып. 2, с. 467-477.
11. Carraway K. L., Koshland D. E. Meth. Enzymol., 1972, v. 25, p. 616-623.
12. Timkovich R. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1977, v. 74, № 2, p. 1663-1668.
13. Горшкова И. И., Лаврик О. И., Филиппов В. В. Молекулярн. биология, 1981, т. 15, вып. 1, с. 62-70.
14. Нурбеков М. К., Судакова Е. С., Фаворова О. О. Биооргани. химия, 1982, т. 8, № 2, с. 200-207.
15. Горшкова И. И., Лаврик О. И., Попов Р. А. Биохимия, 1981, т. 47, вып. 9, с. 1564-1569.
16. Marletta M. A., Kenyon G. L. J. Biol. Chem., 1979, v. 254, p. 1879-1885.
17. Kurzer F., Douraghi-Zadeh K. Chem. Rev., 1967, v. 67, № 2, p. 107-152.
18. Means G. E., Feenly R. E. Chemical modification of proteins. San Francisco: Holden-Day, 1971, p. 144.
19. Невинский Г. А., Лаврик О. И., Газарянц М. Г., Мкртчян Э. С., Акопян Ж. И. Биооргани. химия, 1987, т. 13, № 4, с. 506-518.
20. Seki H., Koga K., Matsuo H., Ohki S., Matsuo S., Yamada S. I. Chem. Pharm. Bull., 1965, v. 19, № 8, p. 995-1000.
21. Kitz R., Wilson J. B. J. Biol. Chem., 1962, v. 237, № 10, p. 3245-3249.

Поступила в редакцию
12.XII.1985
После доработки
3.III.1986

ESSENTIAL CARBOXYLIC GROUPS IN THE M AND M' SUBUNIT ACTIVE SITES OF THE RABBIT SKELETAL MUSCLE CREATINE KINASE

NEVINSKY G. A., GAZARYANTS M. G.*

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

**Institute of Experimental Biology, Academy of Sciences of the
Armenian SSR, Yerevan*

The influence of carboxylic group modification with N-cyclohexyl-N'-β-(4-methylmorpholine)ethylcarbodiimide on the activity of creatine kinase was examined. The modification rate for M- and M'-subunits of the enzyme depends on the reagent concentration and the presence of Mg²⁺ ions. The process is described by linear dependences of logarithms of activity vs. time, indicating a pseudofirst order of reactions. The reagent inactivates M- and M'-subunits of the enzyme at approximately the same rate, modification being characterized by rate constants of 0,17 min⁻¹ and K₁ of 0,17 M. Mild alkaline hydrolysis (pH 9,2) of the modified enzyme leads to partial (30-60%) restoration of its activity. The addition of [¹⁴C]glycine methyl ester results in the irreversible incorporation of radioactivity into the protein. AMP and ATP γ-(p-azidoanilide), the inhibitors acting competitively to nucleotide substrates, protect the enzyme against inactivation with the reagent, whereas creatine and creatine proosphate exert no influence on the modification rate of the enzyme. It is suggested that modification affects the aspartate or glutamate carboxyls at or near the ATP-binding sites in the M- and M'-subunits of the enzyme.