



# БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

том 13 \* № 7 \* 1987

## ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

УДК 577.452.273:2.042

### АНАЛИЗ СТРУКТУРЫ И ФУНКЦИИ АКТИВНЫХ ЦЕНТРОВ КРЕАТИНКИНАЗЫ С ПОМОЩЬЮ АФФИННОЙ МОДИФИКАЦИИ

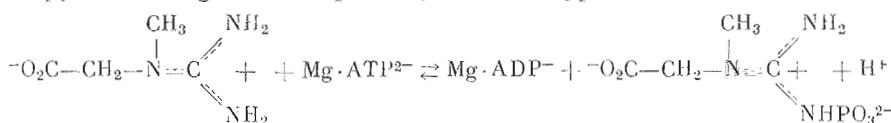
Лаврик О. И., Невинский Г. А.

Новосибирский институт биоорганической химии  
Сибирского отделения Академии наук СССР

На примере креатинкиназы из скелетных мышц кролика (КФ 2.7.3.2) продемонстрированы возможности метода аффинной модификации и аффинной хроматографии для исследования кооперативных взаимодействий, исходной неидентичности субъединиц, расстояния между активными центрами, динамики взаимодействия ферментов с субстратами и аффинными реагентами, локализации аминокислотных остатков в активных центрах.

#### Введение

Креатинкиназа (ATP : креатин-N-фосфотрансфераза (КФ 2.7.3.2)) играет важную роль в энергетическом метаболизме клетки, участвуя в контроле энергетического обмена и осуществлении его связи с мышечным сокращением. Фермент осуществляет обратимый перенос фосфорильной группы от Mg·ATP к креатину согласно уравнению



В тканях различных организмов креатинкиназа присутствует в виде нескольких изоферментов: ММ, МВ и ВВ, которые отличаются по электрофоретической подвижности и ряду других параметров. Основным изоферментом мышц является креатинкиназа, которая относится к ММ-типу. Согласно литературным данным, этот фермент состоит из двух идентичных или почти идентичных субъединиц [1–4]. Димер имеет молекулярную массу 82 000 [1–4]. Определен его общий аминокислотный состав. Каждая полипептидная цепь состоит из 360 аминокислотных остатков. Установлена последовательность аминокислот вблизи реакционноспособной SH-группы (примерно 10% от общего состава) [1], а также последовательность из 20 аминокислотных остатков с N-конца молекулы [5].

Из библиотеки кДНК скелетных мышц кролика с помощью олигонуклеотидных зондов выделено 7 клонов, содержащих кДНК креатинкиназы. Два клона содержали полнокопийную ДНК. Определена нуклеотидная последовательность кДНК креатинкиназы и соответствующая ей аминокислотная последовательность [6].

Для фермента выявлен неупорядоченный механизм связывания субстратов [7, 8]. Оптимальным субстратом является комплекс нуклеотида с двухвалентным металлом [1, 8]. Получены данные, позволяющие предполагать, что в связывании с ионом металла заняты  $\gamma$ - и  $\beta$ -фосфаты молекулы ATP [8]. Показано, что участки связывания нуклеотидного и

Принятые сокращения: oADP, oATP – диальдегидные производные ADP и ATP;  $\varepsilon$ ADP(ATP) – 1,N<sup>6</sup>-этено-ADP(ATP); азидо- $\varepsilon$ ADP(ATP) –  $\beta(\gamma)$ -(n-азидоанилид)-1,N<sup>6</sup>-этено-ADP(ATP); Сма-ATP –  $\gamma$ -[N-метил-N-(2-хлорэтил)]амид ATP.

гидролиза субстрата взаимозависимы. Например, связывание нуклеотида улучшается в присутствии креатина [8, 9]. Некоторые анионы типа нитрата, нитрита, формиата ингибируют креатинкиназу, как полагают, путем образования комплексов фермент· $\text{Mg}^{2+}$ ·ADP·анион·креатин, моделирующих промежуточное состояние реакции [2, 8, 10].

Истинный механизм переноса фосфорильного остатка в настоящее время окончательно не установлен, но есть все основания считать, что реакция протекает по  $S_{\alpha 2}$ -ассоциативному типу [2, 8]. Фермент достаточно интенсивно исследован с помощью группоспецифических химических реагентов. Установлено наличие функционально важных остатков лизина, цистеина, триптофана, аргинина и тирозина в активном центре или вблизи него. Для некоторых из этих остатков: цистеина, лизина, карбоксильных групп остатков аспарагиновой или глутаминовой кислот — предложены гипотетические схемы расположения в активном центре или вблизи него и обсуждена их возможная роль в катализе или субъединичных взаимодействиях. Многое из упомянутого выше и другие вопросы достаточно подробно проанализированы в обзорах [1, 2, 8, 11–14].

Несмотря на то что история исследования креатинкиназы из скелетных мышц кролика насчитывает более 30 лет, до настоящего времени этот фермент остается недостаточно изученным. Для фермента неизвестен точный механизм катализа и остатки аминокислот, принимающие непосредственное участие в этом процессе. Остается неясной роль димерной и мономерной форм фермента в процессе функционирования креатинкиназы и регуляции ее активности.

Многие из вопросов могли бы быть успешно решены с помощью метода рентгеноструктурного анализа. Однако креатинкиназа из скелетных мышц кролика до настоящего времени не получена в кристаллах, качество которых позволило бы провести рентгеноструктурный анализ с высоким разрешением. Кроме того, как известно, структура ферментов в кристаллах и растворе может различаться, и в связи с этим для понимания механизма их катализа необходимо сравнение данных, полученных для белков в кристаллах и растворе.

Одним из наиболее перспективных методов изучения биополимеров и их функций в растворе является метод аффинной модификации. В классическом варианте этот подход был предложен для локализации аминокислотных остатков активного центра либо групп из его непосредственного окружения с помощью аналогов субстратов, несущих реакционноспособные остатки [15]. Однако возможности метода постоянно расширяются. Этот подход применен для решения широкого круга вопросов функционирования многосубстратных олигомерных ферментов [16].

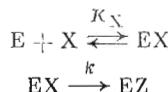
Для аффинной модификации креатинкиназы из скелетных мышц кролика использованы разнообразные реакционноспособные аналоги АТР и ADP, что позволило получить информацию как о структурной организации фермента, так и о деталях его функционирования. Продемонстрированы возможности метода аффинной модификации, имеющие общую значимость для изучения олигомерных многосубстратных ферментов.

## 1. Основные характеристики метода аффинной модификации

Метод аффинной модификации был предложен около 20 лет назад и основывался на весьма привлекательной идеи направленного воздействия на активный центр фермента либо на его непосредственное окружение за счет образования специфического комплекса аналога субстрата с активным центром. За прошедшие годы метод получил широкое применение, что следует из большого числа публикаций на эту тему, в том числе обзорного характера [16–20]. Аналогичный подход был сформулирован для направленной модификации нуклеиновых кислот. Этот подход основан на принципе комплементарного взаимодействия «адреса», несущего реакционноспособную группу, и атакуемого биополимера [21].

Классический вариант аффинной модификации предполагает взаимодействие реагента с биополимером согласно схеме 1

*Схема 1*



(X – реагент, E – фермент, Z – продукт ковалентного присоединения), в которой первая стадия отражает специфическое комплексообразование реагента с активным центром фермента, а вторая – ковалентное присоединение аналога к биополимеру.

Основные требования к аффинным реагентам и критерии аффинности модификации наиболее полно обсуждены в монографии [16]. Однако следует их привести здесь, так как это необходимо для анализа экспериментальных данных по модификации креатинкиназы.

1. Аффинный реагент должен быть субстратом или конкурентным по отношению к субстрату ингибитором фермента.

2. Модификация должна проходить по определенной группе в активном центре или вблизи него и сопровождаться потерей активности биополимера.

3. Начальная скорость модификации биополимера должна изменяться в зависимости от начальной концентрации реагента по гиперболическому закону, достигая предельного значения при достаточно высоких концентрациях реагента.

4. Природный лиганд должен защищать биополимер от модификации, т. е. тормозить процесс аффинной модификации. Средство реагента, характеризуемое константой диссоциации комплекса биополимер – реагент ( $K_X$ ), может быть определено из зависимости начальной скорости модификации от концентрации реагента. Эта величина должна в пределах точности эксперимента совпадать с той же величиной, определяемой из прямых опытов по ингибированию реагентом связывания с биополимером природного лиганда.

Предложены также варианты направленного введения метки в активный центр, основанные на других схемах взаимодействия реагента с ферментом. Одна из них предполагает ковалентное введение метки в результате превращения субстрата в активное соединение в ходе его каталитической конверсии, так называемое мечение активного центра по типу «самоубийства» [16, 22].

Введение метки как результат самой ферментативной реакции предложено для ДНК-зависимой РНК-полимеразы [23]. В этом случае первое звено в направляемой матрицей реакции полимеризации ковалентно присоединяется к белку за счет реакционноспособной группы аффинного субстрата. Второе звено, содержащее радиоактивную метку, присоединяется к первому в результате реакции полимеризации. Таким образом, сам фермент (с помощью его каталитической функции) «выявляет» область активного центра.

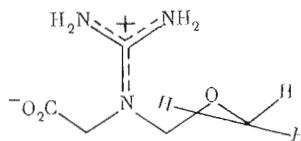
В ходе развития метода аффинной модификации для него помимо локализации структурных элементов активных центров были предложены другие возможности использования. Исследование сложных ферментативных систем показало значительную чувствительность как уровня ковалентного мечения, так и скорости аффинной модификации к кооперативным взаимодействиям [24, 25], что в ряде случаев послужило основой для выявления с помощью этого метода структурных и динамических проявлений кооперативных взаимодействий активных центров [26, 27]. Впервые такие возможности были реализованы при изучении аминоацил-РНК – синтетаз [16, 20, 26, 27].

Накопление значительного экспериментального материала по конструированию аффинных реагентов и их использованию в различных системах показало, что далеко не во всех случаях достижимо выполнение всех перечисленных требований к аффинным реагентам. В большом числе случаев они выполняются лишь частично. Скорее всего это указывает не на отсутствие аффинного характера модификации, а на несовершенство рассмотренной выше простейшей кинетической схемы процесса, полож-

женной в основу создания критерииев аффинной модификации. Эта модель не учитывает возможного структурного многообразия комплексов аналогов субстрата с активным центром фермента, динамической перестройки этих комплексов при взаимодействии с активным центром фермента, существования нескольких подобных или одинаковых центров связывания для одного и того же лиганда и возможность их кооперативного взаимодействия и, наконец, кинетических сложностей самой реакции ковалентного мечения активного центра фермента. Некоторые из этих проблем проанализированы в монографии [16]. Однако уже сейчас этот анализ не является полным, что можно увидеть далее при рассмотрении данных по аффинной модификации креатинкиназы.

## 2. Классическая схема аффинного мечения креатинкиназы реационноспособными аналогами субстратов

Аффинная модификация креатинкиназы из скелетных мышц кролика впервые была проведена с помощью эпоксикреатина, являющегося ее субстратом [8, 28]:



Инкубация креатинкиназы с эпоксикреатином приводила к инактивации фермента. Активность фермента не восстанавливалась после интенсивного диализа. Зависимость скорости инактивации киназы от концентрации реагента описывалась кривой с насыщением. Креатин полностью защищал фермент как от инактивации, так и от ковалентного присоединения реагента. Стехиометрия ковалентного присоединения аналога соответствовала числу активных центров для связывания креатина. Таким образом, по совокупности экспериментальных данных эпоксикреатин удовлетворял критериям аффинной модификации.

Аффинная модификация АТР-узлающего участка креатинкиназы была впервые осуществлена с помощью алкилирующего производного АТР —  $\gamma$ -[4-(N-метиламино-N-(2-хлорэтил)бензил]амида АТР [29]. Затем для этих целей был использован фотоактивный  $\gamma$ -амид АТР:  $\gamma$ -*n*-азидоанилид АТР [30, 31]. Первый из названных аналогов АТР в водном растворе образует реакционноспособный этилениминиевый катион, который затем взаимодействует с подходящими нуклеофильными акцепторами [32]. Механизм превращения ароматических азидов под действием ультрафиолетового облучения в случае второго аналога был исследован в работах [33, 34]. Образующийся ароматический бирадикал нитрена в водном растворе превращается в соединение хиноидной структуры, которое проявляет реакционную способность по отношению к нуклеофильным группам остатков аминокислот.

Модификация фермента обоими аналогами (алкилирующим и фотоактивным) удовлетворяла большинству критерииев аффинной модификации [29–31, 35, 36]. Уровень инактивации фермента соответствовал уровню ковалентного присоединения аналогов. Количество аналога, ковалентно присоединенного к ферменту, равно 2 моль на 1 моль белка, т. е. соответствует числу активных центров креатинкиназы. Mg·ADP, Mg·АТР защищают фермент от инактивирующего действия аналогов [29–31]. При модификации креатинкиназы  $\gamma$ -*n*-азидоанилидом АТР наблюдался частичный защитный эффект креатина и полная защита при совместном добавлении нуклеотидов и гуанидиновых субстратов [30, 31]. Пептидные карты триптического гидролизата креатинкиназы, модифицированной  $\gamma$ -*n*-азидоанилидом [ $^{14}$ C]АТР, выявили два радиоактивномеченных пептида [30].

В процессе инактивации фермента в результате ковалентного присоединения аналогов проявлялась отчетливая двухфазность [29, 31, 35, 36], что было позже объяснено неидентичностью субъединиц креатинкиназы.

Подобным образом можно объяснить и некоторые отклонения от классического варианта в характере защитных эффектов нуклеотидов. Анализу этих вопросов посвящен следующий раздел.

К классическому случаю с точки зрения выполнимости критериев аффинности можно также отнести модификацию креатинкиназы 2',3'-диальдегидными производными АТР(оАТР) и ADP(оADP), полученными окислением соответствующих нуклеотидов периодатом натрия [37], а также алкилирующим аналогом АТР, производным азотистого иприта [38].

Оба диальдегидных аналога нуклеотидов — субстраты креатинкиназы. оADP проявляет субстратные свойства в реакции переноса фосфорильного остатка на нуклеотид, а производное АТР — в реакции переноса фосфорильного остатка с нуклеозид-5'-трифосфата на креатин. Величины  $K_m$  для 2',3'-диальдегидных производных близки таковым для исходных АТР и ADP. Например, в случае оADP и ADP они совпадают и равны 2,6 мМ. Окисление рибофуранозного цикла молекулы ADP не влияет на средство нуклеотида к ферменту, но приводит к уменьшению максимальной скорости его превращения в 4–5 раз.

При инкубации креатинкиназы с окисленными аналогами АТР и ADP наблюдалась инактивация фермента. Характер инактивации свидетельствовал о псевдолинейном порядке реакции модификации. Зависимость скорости инактивации креатинкиназы от концентрации оADP описывалась кривой с насыщением [37]. Из данных по инактивации были найдены величины  $k_{\text{инак}}$  реакции модификации креатинкиназы с помощью оADP ( $8 \cdot 10^{-3}$  мин $^{-1}$ ) и  $K_d$  обратимого комплекса фермента с оADP (62 мКМ). Величина  $K_d$ , найденная из зависимости скорости модификации от концентрации реагента, совпадала с величиной  $K_d$  (64 мКМ), полученной в работе [39] для комплекса фермента с ADP методом флуоресцентного титрования.

Полной инактивации фермента соответствует ковалентное присоединение 2 моль аналога на 1 моль фермента, как в случае [ $^{14}\text{C}$ ]оADP, так и в случае [ $^{14}\text{C}$ ]оАТР. Добавление как ADP, так и АТР приводит к полной защите от ковалентного присоединения соответствующих диальдегидных аналогов. Однако добавление ADP (5 мМ) не полностью защищает фермент от инактивации. Для выяснения причин отсутствия полной защиты киназы от инактивации было исследовано влияние ADP на активность фермента. Оказалось, что инкубация киназы с ADP (5 мМ) в течение 2,5–3 ч уменьшает активность креатинкиназы на 20–25 %. Аналогичный эффект инактивации фермента на 20–25 % наблюдается при добавлении в реакционную смесь одновременно ADP (5 мМ) и оADP (0,17 мМ). Возможно, что отсутствие полной защиты фермента от инактивации оADP в присутствии ADP является следствием инактивирующего действия самого нуклеотида при его высоких концентрациях. Примеры такого влияния описаны в литературе [40].

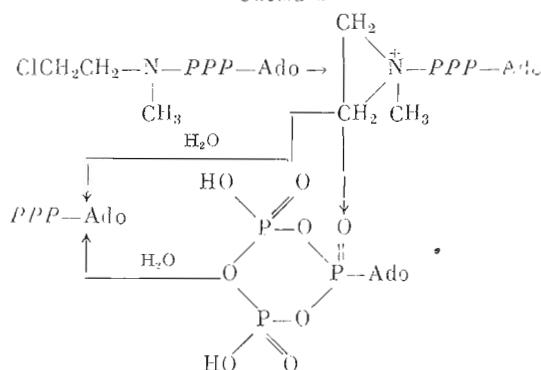
Аффинный характер модификации креатинкиназы окисленными аналогами нуклеотидов указывал на блокирование ε-аминогруппы остатка лизина вблизи участка активного центра фермента, связывающего рибозу нуклеотида, так как нуклеотиды, окисленные по рибозе, обычно селективно модифицируют остатки лизина и не модифицируют остатки других аминокислот [41]. Доказательство образования основания Шиффа между оADP и остатком лизина креатинкиназы было получено при сравнении включения  $^3\text{H}$ -метки в нативный белок, модифицированный оADP после обработки  $[^3\text{H}]$ боргидридом натрия. Креатинкиназа, инактивированная на 80–90 %, содержала, согласно уровню включения  $^3\text{H}$ -метки, 0,6–0,8 N=C-связей на субъединицу фермента или 1,3–1,6 таких связей на димер.

Модификация креатинкиназы 2',3'-диальдегидными производными АТР и ADP является примером использования аналогов, содержащих группоспецифические химические группы. В то же время далеко не во всех случаях с помощью АТР, окисленного по рибозе периодатом натрия, удается направлению заблокировать АТР- узнающие участки нуклеотидзависимых ферментов. Например, у фенилаланил-тРНК-сингтетазы из

*E. coli* окисленный АТР модифицирует центры связывания тРНК и другие участки фермента. В этом случае специфичность его действия не отличается от пиридоксальфосфата [42]. Отсутствие аффинного характера мечения с помощью окисленного АТР показано также в работе [43]. Поэтому направленную модификацию активных центров креатинкиназы с помощью подобных аналогов, которая достигнута в работе [37], можно считать безусловной удачей.

Для модификации АТР-узлающих участков креатинкиназы был использован алкилирующий аналог АТР —  $\gamma$ -[N-метил-N-(2-хлорэтил)]-амид АТР (Сма-АТР), который обладает реакционной способностью по отношению к различным нуклеофильным акцепторам и подвергается в растворе превращениям согласно схеме 2 [38, 44].

Схема 2



В ходе гидролиза Сма-АТР кинетика накопления ионов хлора [38, 44] совпадает с кинетикой накопления протонов и образования АТР. При добавлении в раствор Сма-АТР тиосоединений наблюдается их алкилирование. Соотношение продуктов фосфорилирования и алкилирования первичных аминов в условиях деионизации аминогруппы (рН 10 и выше) зависит от концентрации аминов в реакционной смеси, но при больших концентрациях аминов (0,2–1 М) преобладает реакция алкилирования. Очевидно, что при использовании Сма-АТР в качестве аффинного реагента для модификации ферментов ход реакции (fosфорилирование или алкилирование) и структура продукта будут зависеть от того, какие группы и каким образом расположены относительно  $\gamma$ -фосфата и этиленимиинового катиона (продукта циклизации Сма-АТР, см. схему 2) и хлорэтильной группировки аналога АТР. Следовательно, такого рода аналоги могут модифицировать практически все нуклеофильные группы остатков аминокислот.

В работе [38] были получены кинетические кривые инактивации креатинкиназы при различных концентрациях Сма-АТР в присутствии и в отсутствие ионов  $\text{Mg}^{2+}$ . Зависимости логарифма остаточной активности фермента от времени инкубации с Сма-АТР при различных концентрациях реагента в обоих случаях были линейными. Это указывало на псевдодвухстадийный порядок реакции модификации киназы аналогом АТР как в присутствии ионов магния, так и без них. Из линейных зависимостей величин  $k_{\text{инак}}$  реакции инактивации от концентрации Сма-АТР (в обратных координатах) были оценены величины  $K_d$  комплексов креатинкиназы в отсутствие и в присутствии ионов  $\text{Mg}^{2+}$  (1,0 и 1,5 М соответственно), а также соответствующие константы максимальных скоростей инактивации фермента Сма-АТР ( $2,1 \cdot 10^{-3}$  и  $1,2 \cdot 10^{-3} \text{ с}^{-1}$ ). С помощью метода флуоресцентного титрования было показано, что величина  $K_d$  комплекса киназы с  $\gamma$ -[N-метил-N-(2-оксиэтил)]амидом АТР, равная 0,28 М, увеличивается в 3 раза (0,95 М) при добавлении ионов магния. Таким образом, величины, характеризующие сродство к ферменту химически неактивного оксианалога и реакционноспособного хлораналога, вполне сопоставимы.

Полной инактивации фермента Ста-АТР соответствует ковалентное присоединение 1,7–1,8 моль аналога на 1 моль фермента, т. е. ковалентному блокированию подвергаются оба активных центра функционального димера.

Исследование защитного действия субстратов АТР и ADP на процесс инактивации фермента Ста-АТР выявило ряд особенностей. Добавление ADP (5 мМ) в реакционную смесь в отсутствие ионов магния приводит только к частичной защите фермента от инактивации. Защитный эффект ADP был полным, когда в реакционную смесь добавляли ацетат магния. АТР полностью защищал креатинкиназу от инактивации даже в отсутствие ионов магния. Mg·ADP полностью защищает фермент не только от инактивации, но и от ковалентного присоединения Ста-АТР к белку. Таким образом, практически все требования к аффинному реагенту оказываются выполненными для этого аналога.

Несмотря на то что реакционноспособная группа Ста-АТР обладает широким спектром действия, оказалось возможным оценить группировку активного центра, подвергающиеся модификации с помощью аналога. Величина рК модифицируемых групп совпадает с таковой для остатка гистидина (7,6–7,7). Остаток гистидина, согласно данным ЯМР [45], возможно, выполняет роль общего кислотно-основного катализатора, де-протонирующего тианидипиевую группу креатина при фосфорилировании последнего Mg·АТР, и локализован в участке связывания креатина. На основании совпадения величин рK, а также проявления защитного эффекта креатина при модификации фермента Ста-АТР было сделано предположение, что модификации в ферменте подвергается именно этот остаток гистидина. По совокупности полученных данных следовало полагать, что фосфорилирования фермента аналогом не происходит. Во-первых, инкубация модифицированной аналогом киназы при 30°С в течение 3 ч при pH 6,0 не приводит к какому-либо восстановлению активности фермента, несмотря на заметный гидролиз фосфамидной связи между γ-фосфатом АТР и азотом имидазола. Кроме того, как следует из гипотетической модели строения активного центра креатинкиназы, сформулированной согласно работам Милдвана и др. [45, 46] по данным ядерной релаксации, расстояние между γ-фосфатом Ста-АТР и имидазолом с рK 7,7 можно оценить равным 4,5 Å, что практически исключает возможность фосфорилирования этого остатка с образованием фосфамидной связи. Из-за большого расстояния между остатком имидазола и молекулой АТР в активном центре фермента мало вероятна и реакция алкилирования этого остатка через образование этилениминиевого катиона в молекуле Ста-АТР. Размер N – CH<sub>2</sub> – CH<sub>2</sub>-фрагмента Ста-АТР можно оценить равным 2,6–3 Å. В связи с этим разумно предположить, что реакция ковалентного присоединения протекает по S<sub>N2</sub>-механизму при непосредственном взаимодействии атома азота остатка гистидина с атомом углерода (CH<sub>2</sub> – Cl), содержащего частичный положительный заряд.

Об этом свидетельствует и величина максимальной скорости модификации фермента Ста-АТР ( $2,1 \cdot 10^{-3}$  с<sup>-1</sup>), на порядок большая, чем величина константы скорости образования этилениминиевого катиона в молекуле Ста-АТР ( $2,4 \cdot 10^{-4}$  с<sup>-1</sup>). Высокая скорость модификации фермента по S<sub>N2</sub>-механизму без предварительного образования этилениминиевого катиона может быть обусловлена высокой эффективной концентрацией нуклеофила вблизи химически активной группы аналога АТР, возникающей после образования комплекса Ста-АТР с киназой. Как следует из литературы [47], эффективная концентрация при образовании прочного комплекса лиганда с ферментом может превышать реальную концентрацию лиганда на 3–6 порядков.

О прямом алкилировании остатка гистидина с помощью Ста-АТР по S<sub>N2</sub>-механизму говорит также высокая энергия активации реакции модификации фермента (39 ккал/моль), в то время как энергия активации образования этилениминиевого катиона несколько меньше (30 ккал/моль). В связи с вышесказанным следует отметить, что Ста-АТР является аффинным реагентом ДНК-зависимой РНК-полимеразы из *E. coli*, причем в

этом случае в отличие от креатинкиназы протекает фосфорилирование остатка гистидина в активном центре фермента [44].

### 3. Отрицательная кооперативность активных центров или исходная неэквивалентность субъединиц?

Несмотря на соблюдение для большинства реакционноспособных аналогов нуклеотидов критерия аффинной модификации креатинкиназы в их взаимодействии с ферментом обнаружилась общая особенность — неэквивалентность модификации ее активных центров [31, 35–38]. Две различающиеся величины констант диссоциации были найдены при исследовании комплексообразования креатинкиназы с переакционноспособными  $\gamma$ -амидами АТР:  $\gamma$ -анилидом АТР,  $\gamma$ -бензиламидом АТР,  $\gamma$ -[N-метил-N-(2-оксиэтил)]амидом АТР и  $\gamma$ -[4-(N-метиламино-N-(2-оксиэтил)бензил]амидом АТР методом флуоресцентного титрования [48, 49].

Неэквивалентность при связывании субстратов креатинкиназы (отрицательная кооперативность) наблюдалась ранее при комплексообразовании Mg·ADP с ферментом в присутствии креатина и нитрата [2, 8, 50].

Химическая модификация креатинкиназы с помощью различных реагентов, блокирующих тиоловые группы (например, иодацетамид), также показала различные в скоростях модификации субъединиц креатинкиназы как в присутствии, так и в отсутствие различных лигандов реакции [1, 8, 51–53].

На основании данных по химической модификации креатинкиназы Дегани [54–56] объяснили неэквивалентность ее активных центров асимметричной ассоциацией в димере исходно эквивалентных субъединиц. Возможность такого типа укладки субъединиц подтверждают данные рентгеноструктурного анализа для некоторых ферментов. Асимметричные димеры образуют, например, гексокиназа [57] и фосфофруктокиназа [58]. Эти белки, так же как и креатинкиназа, являются трансферазами.

В то же время не только таким способом можно объяснить неидентичное поведение субъединиц в функциональном димере. Можно представить по крайней мере четыре различных механизма, объясняющих отрицательную кооперативность и родственное явление «half-of-the-sites reactivity», т. е. ситуацию, когда только половина активных центров фермента эффективно катализирует реакцию [59]. Активность половины центров может быть следствием как отрицательной кооперативности в связывании лигандов, так и затрудненности дальнейших стадий превращения субстратов. Поэтому в определенном смысле это свойство является более общим отражением кооперативных взаимодействий в функциональном димере.

Возможные механизмы, объясняющие «half-of-the-sites reactivity», были проанализированы Левицким с соавт. [60]. Прежде всего субъединицы функционального димера могут быть структурно неэквивалентны. Для такого различия, по-видимому, достаточно замены или модификации одной или нескольких аминокислот в активном центре одной из субъединиц, как это наблюдается в случае изоферментов. Несмотря на то что подобное объяснение можно считать наиболее простым, привести примеры такой структурной организации функциональных димеров пока не представляется возможным.

Альтернативный вариант может быть представлен в случае асимметричной ассоциации двух изначально равнозначенных полипептидных цепей, когда возможная причина неидентичного поведения активных центров является следствием близкого расположения их на соседних субъединицах, затрудняющего связывание лиганда обоими активными центрами одновременно. Например, при комплексообразовании tРНК с амилоцилл-tРНК-синтетазами отрицательная кооперативность может быть объяснена электростатическим отталкиванием двух близко расположенных молекул tРНК [61].

Наконец, функциональный димер может быть построен симметрично из двух изначально равнозначенных субъединиц. Неэквивалентность актив-

ных центров в этом случае может возникать при связывании лигандов в результате конформационных перестроек белка, индуцируемых лигандами. Такое объяснение активности половины центров было предложено для щелочной фосфатазы [62], малиндиндрогеназы [63], цитидинтрифосфатсигматазы [60].

Подобный механизм является весьма вероятным для тирозил-тРНК-сигматазы из *Bacillus stearothermophilus*. Этот фермент проявляет отчетливую отрицательную кооперативность во взаимодействии с субстратами [64–66]. В то же время показано, что субъединицы в функциональном димере расположены симметрично и в исходном состоянии эквивалентны [67].

Несколько фактов могло указывать в пользу возможной исходной неидентичности субъединиц креатинкиназы. При анализе ММ-фермента из мышц кролика в работе [3] обнаружены две полосы при электрофорезе в присутствии денатурирующих реагентов, что, с точки зрения авторов, могло указывать на отличие размеров полипептидных цепей субъединиц на 15 остатков. В этом случае молекулярные массы субъединиц были бы равными 42 100 и 40 300. Однако, не имея других данных о различии в субъединицах, авторы предположили, что эти полосы соответствуют субъединицам, исходно эквивалентным, но подвергшимся протеолизу на разную глубину.

Три изоферментные формы креатинкиназ типа ММ (ММ, ММ' и М'М') были обнаружены при изоэлектрическом фокусировании и последующей гибридизации ферментов, выделенных из скелетных мышц кролика [57, 68], свиньи [69] и сыворотки крови человека [70]. Авторы этих работ, к сожалению, не исследовали других характеристик изоферментов ММ, ММ' и М'М'.

Известно, что креатинкиназа из скелетных мышц кролика эффективно катализирует прямую и обратную реакцию в достаточно широком диапазоне рН: от 5 до 10 [1], что может указывать в пользу функциональной неидентичности субъединиц фермента, поскольку нуклеофильные группы боковых цепей отдельных аминокислот имеют достаточно узкий диапазон рН, в котором происходит их протонирование или депротонирование, и, следовательно, не могут с одинаковой эффективностью участвовать в катализе реакций во всем диапазоне рН от 5 до 10.

Для решения вопроса о том, что же является причиной разного поведения субъединиц креатинкиназы — их исходная неэквивалентность или другие факторы, было предложено разделить эти субъединицы в условиях диссоциации димерной формы на колонке с иммобилизованным  $\gamma$ -(6-аминогексил)амидом АТР [35, 36]. Таким образом были получены препараты креатинкиназы, содержащие элюирующиеся при нанесении М-субъединицы (50% от нанесенного белка) и при промывке солью М'-субъединицы фермента. Оказалось, что препараты фермента, состоящие только из М-субъединиц или только из М'-субъединиц, катализируют как прямую, так и обратную реакции, однако при разных рН. Оптимумы рН обратной реакции для ММ- и М'М'-киназ находятся в диапазонах 7,7–8,3 и 5,0 и ниже соответственно. Оптимумы рН реакций в направлении образования креатинфосфата для ММ- и М'М'-ферментов равны 8,5–9,5 и 5,2–5,8 соответственно. Таким образом, одна из субъединиц фермента оказалась более активной при  $pH > 6,5$ , а вторая наоборот — при более кислых рН. Совокупность полученных данных свидетельствовала о том, что при высоких концентрациях белка и  $pH > 7,5$  отдельные субъединицы фермента существуют в виде димерных форм ММ, ММ' и М'М' [35, 36]. Содержание мономерных и олигомерных форм фермента зависит от концентрации белка. Для простоты изложения далее будем называть препараты креатинкиназы, состоящие только из М- или М'-субъединиц, ММ- и М'М'-киназами, а из М- и М'-ММ'-формой.

Данные по аффинному разделению субъединиц свидетельствовали об их исходной функциональной неидентичности. Однако оставался открытым вопрос об их структурной неидентичности. В связи с этим была исследована электрофоретическая подвижность ММ- и М'М'-белков в при-

существии и в отсутствие денатурирующих агентов, что выявило различие в электрофоретической подвижности M- и M'-субъединиц [35, 36].

Различие в электрофоретической подвижности субъединиц, с нашей точки зрения, может быть не только следствием отличия в молекулярной массе. Например, в работе [71] показано изменение электрофоретической подвижности препаратов креатинкиназы при окислении ее тиоловых групп. Очевидно, что в этом случае изменение подвижности не связано с изменением молекулярной массы белка. Таким образом, вопрос о характере различий M- и M'-субъединиц креатинкиназы не может быть разрешен до установления полной первичной структуры отдельных субъединиц.

Как было указано выше, три изоферментные формы креатинкиназ обнаружены в мышцах свиньи [69]. Для MM- и M'M'-форм фермента была установлена последовательность из 45 остатков с N-конца. Обнаружено, что первичные структуры M- и M'-субъединиц идентичны, за исключением аминокислотных остатков в положениях 1 и 23 полипептидной цепи, где в одной из субъединиц расположены соответственно остатки пролина и серина, а в другой — серина и лейцина. В то же время анализ кДНК креатинкиназы из скелетных мышц кролика выявил единственную нуклеотидную последовательность и соответствующую ей последовательность аминокислот [6]. Поскольку использованный подход не является универсальным для извлечения кДНК с измененными последовательностями, вопрос о возможном различии в первичных структурах неидентичных M- и M'-субъединиц остается открытым. В то же время следует отметить возможность возникновения неидентичности субъединиц фермента на других этапах формирования структуры креатинкиназы вплоть до модификации MM- или M'M'-форм в результате направленного фосфорилирования одной из субъединиц, окисления тиоловых групп и других типов модификации белка [72]. Специфичность модификации только одной из субъединиц в свою очередь может быть обусловлена их асимметричной укладкой в димере. Для подтверждения этих предположений необходим прямой структурный анализ M- и M'-субъединиц белка в сочетании с рентгеноструктурным анализом высокого разрешения.

Таким образом, креатинкиназа из скелетных мышц кролика скорее всего состоит из неидентичных субъединиц. Различная степень комплексообразования субъединиц с иммобилизованным нуклеотидом, с нашей точки зрения, иллюстрирует эффективность связывания  $\gamma$ -амидов нуклеотидов с активными центрами M- и M'-субъединиц фермента, что уже обсуждалось выше.

Неидентичность поведения субъединиц функциональных димеров отчетливо проявляется в закономерностях аффинной модификации ферментов аналогами субстратов. В частности, аффинная модификация с помощью аналогов тРНК позволила направленно блокировать только один из центров димерных триптофанил- [73] и фенилаланил-тРНК-синтетаз [74], а с помощью моноэфиров фосфорной кислоты выявить отрицательную кооперативность активных центров неорганических пирофосфатаз [75]. Анализ продуктов аффинной модификации позволяет установить причины неидентичного поведения центров в функциональном димере: исходные структурные различия субъединиц и их функциональную неэквивалентность, являющуюся результатом кооперативного взаимодействия активных центров. Этот вопрос был проанализирован при модификации функционального димера — фенилаланил-тРНК — синтетазы с помощью алкилирующего аналога тРНК [26, 27]. Было показано, что конечные продукты модификации в условиях, когда блокируется только один из центров функционального димера (малые избытки реагента), и в том случае, когда блокируются оба центра фермента (большие избытки реагента), различаются. Однако и в том и другом случае образуется только по одному продукту. Эти результаты могут быть объяснены кооперативными перестройками активных центров димеров в комплексах с одной или двумя молекулами реагента. При наличии исходной структурной неэквивалентности при больших избытках реагента следует ожидать смеси продуктов.

Таким образом, анализ кинетики аффинной модификации и конечных

продуктов мечения позволяет установить причину неидентичного поведения активных центров функционального димера. Следует заметить, что исходная неэквивалентность активных центров олигомеров не исключает возможности их дополнительной неэквивалентности, возникающей при взаимодействии с продуктами реакции, что делает анализ причин неидентичного поведения еще более сложным.

С целью выявления различий в процессах модификации M- и M'-субъединиц креатинкиназы проведена модификация фермента  $\gamma$ -*n*-азидоанилидом АТР. Активность фермента после облучения уменьшается с большей скоростью и на большую глубину при ее определении в обратной реакции при pH 8,5, чем при pH 5,3. Поскольку было показано, что при pH 8,5 в активность креатинкиназы должна вносить больший вклад M-субъединица, а в случае определения активности при pH 5,3 M'-субъединица [35, 36], следует полагать, что M-субъединица модифицируется аналогом с большей скоростью, чем M'-субъединица. В то же время добавление в облучаемую смесь ADP приводит к защите в основном только M-субъединицы и в очень малой степени влияет на модификацию M'-субъединицы киназы. В отсутствие ADP к ферменту присоединяется 1,6–1,7 моль аналога на 1 моль димерного фермента. Добавление ADP в облучаемую смесь приводит к защите от ковалентного присоединения 1,0–1,1 моль аналога на 1 моль фермента. Отсутствие полной защиты от инактивации и от ковалентного присоединения скорее всего связано с модификацией M'-субъединицы [36, 37].

Различие в скоростях модификации M- и M'-субъединиц креатинкиназы было показано также при взаимодействии фермента с  $\gamma$ -*n*-азидоанилидом  $\epsilon$ АТР [39]. Однако в этом случае в отличие от производного АТР с большей скоростью модифицировалась M'-субъединица.

Различие во взаимодействии креатинкиназы с АТР,  $\epsilon$ АТР и их аналогами [39] проявляется уже на уровне комплексообразования. Средство этенированных соединений примерно на порядок выше, чем АТР и его аналогов. Принимая во внимание отсутствие субстратных свойств у  $\epsilon$ АТР, разумно предположить, что различие в эффективности комплексообразования, а также в скоростях модификации M- и M'-субъединиц фермента в случае фотоактивных производных АТР и  $\epsilon$ АТР – следствие образования различного типа комплексов этих реагентов с одними и теми же участками активных центров фермента. При модификации киназы  $\gamma$ -*n*-азидоанилидом  $\epsilon$ АТР характер защитных эффектов также имеет свои особенности [39]. По сравнению с ADP и в особенности с АТР наиболее выраженным защитным действием обладает  $\epsilon$ АТР. Различие в защите ADP M- и M'-субъединиц также гораздо меньше выражено в случае  $\gamma$ -*n*-азидоанилида АТР, чем аналога  $\epsilon$ АТР. Не исключено, что на обеих субъединицах фермента или по крайней мере на одной из M- и M'-субъединиц фотоактивные аналоги АТР и  $\epsilon$ АТР модифицируют различные аминокислотные остатки фермента.

Заметное различие в скоростях модификации M- и M'-субъединиц креатинкиназы наблюдалось также при модификации фермента алкилирующим аналогом АТР –  $\gamma$ -[N-метил-N-(2-хлорэтил)]амидом АТР [38]. Согласно зависимостям скоростей инактивации субъединиц от pH реакционной смеси, в обеих субъединицах фермента модификации подвергаются остатки гистидина с величиной рК, равной 7,7 (см. также раздел 2).

Окисленные периодатом натрия би- и монофункциональные аналоги АТР образуют основания Шиффа с  $\epsilon$ -аминогруппами остатков лизина M- и M'-субъединиц фермента также с разными скоростями [37, 76]. Имидазолиды AMP, ADP и АТР модифицируют различные субъединицы фермента со скоростями, различающимися в 50–100 раз [77]. Причины различия в скоростях модификации M- и M'-субъединиц фермента, по-видимому, отличаются для разных аналогов. При модификации фермента фотоактивными аналогами АТР,  $\epsilon$ АТР и ADP разница в скоростях модификации субъединиц исчезает при насыщающих концентрациях реагентов. Скорее всего в этих случаях при использовании низких концентраций аналогов она обусловлена разным средством M- и M'-субъединиц к

реагентам. Модификация фермента алкилирующими аналогами АТР, 2',3'-диальдегидными производными нуклеотидов и имидазолидами АМР, АДР и АТР характеризуется различными максимальными скоростями инактивации M- и M'-субъединиц. Эта разница в скоростях модификации субъединиц сохраняется при насыщающих концентрациях реагентов, а следовательно, не связана с разным средством активных центров фермента к аналогам. Более вероятно, что наблюдаемое отличие является следствием различной нуклеофильности аминокислотных акцепторов, возникающей за счет изменения их микроокружения, либо различия во взаимной ориентации химически активной группы реагента и блокируемой группы белка в активных центрах неидентичных субъединиц.

Несмотря на то что  $\gamma$ -*p*-азидаанилид АТР, согласно данным работы [30], модифицирует на обеих субъединицах креатинкиназы тиоловые группы, анализ пептидных карт триптического гидролизата фермента показал наличие двух пятен близкой интенсивности. Это также может указывать на возможное различие первичных структур M- и M'-субъединиц креатинкиназы.

#### 4. Влияние процессов ассоциации и диссоциации

субъединиц креатинкиназы на ее активность.

Оценка расстояний между активными центрами димера

На ранних этапах исследования креатинкиназы предполагалось, что фермент проявляет активность только в виде димерной формы [2]. Затем было показано, что изолированные (ковалентно связанные с сорбентом) субъединицы фермента также обладают катализической активностью [2, 78]. В работе [79] показана возможность разделения моно- и димерных форм креатинкиназы с помощью метода тель-фильтрации. Полученные таким образом мономеры креатинкиназы оказались в 30–50 раз активнее димерных форм.

Совокупность данных, полученных в работах [35, 36], может указывать на образование из активных M- и M'-субъединиц креатинкиназы менее активных димеров: MM, MM' и M'M'. Сделано предположение о том, что процессы ассоциации – диссоциации имеют значение для регуляции активности креатинкиназы. В работе [79] показано, что при высоких концентрациях белка возможно образование тетramerной формы креатинкиназы.

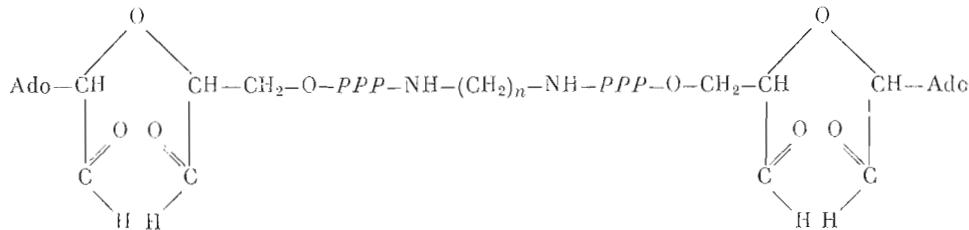
Одной из причин уменьшения ферментативной активности олигомера при ассоциации мономеров (протомеров) может быть стерическое экранирование активных центров фермента [80]. Подобный эффект наблюдается, например, в случае эстрadiол-17-дегидрогеназы из плаценты человека [81] и фосфорилазы В из скелетных мышц кролика [82]. Для глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы из мышц крысы также наблюдается уменьшение активности фермента при формировании олигомера. Однако это объясняется характером регуляторных взаимодействий центров в олигомере [83].

Для анализа вопроса о причинах понижения активности креатинкиназы при образовании димерных форм представляло интерес оценить расстояние между активными центрами димерной формы белка. Исследование креатинкиназы с помощью метода рентгеноструктурного анализа не позволило решить этот вопрос [1]. Для определения расстояния между активными центрами нуклеотидзависимых ферментов в работах [84, 85] были предложены бифункциональные аналоги АТР – производные полиметилендиаминов следующей структуры: Ado $5'$ –*PPP*–NH–(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>–NH–*PPP*–5'Ado, где n=0–8. Ряд предложенных соединений обеспечивал большой диапазон расстояний между остатками АТР и мог оказаться достаточно универсальным для рассматриваемых целей. Впервые эти аналоги были использованы для исследования фенилаланил-тРНК-синтетазы [85].

Описанные аналоги АТР проявляли конкурентный по отношению к АДР тип ингибиции креатинкиназы [76]. Величины K<sub>i</sub> для всех ана-

логов АТР ( $n=0-8$ ) были практически одинаковыми (1,1–1,9 мМ), за исключением производного триметилендиамина. Величина  $K_i$  для последнего была найдена равной 0,1 мМ, что примерно на порядок меньше, чем для других бифункциональных производных. Повышенное сродство этого аналога объясено одновременным взаимодействием остатков производного триметилендиамина с обоими центрами бифункционального димера. При переходе от одного бифункционального аналога к другому длина мостика увеличивается примерно на 1–2 Å. Не исключена ситуация, когда ни один из аналогов не может обеспечивать максимально эффективного взаимодействия двух остатков АТР с активными центрами функционального димера. После образования комплексов одного из остатков аналога с первой субъединицей димера второй остаток АТР может располагаться вблизи второго нуклеотидсвязывающего участка фермента, образуя с ним менее эффективный комплекс. Во всех использованных бифункциональных аналогах АТР трифосфатные группы разных остатков АТР направлены «павстречу» друг другу. Если трифосфатные группы двух молекул АТР в разных активных центрах димера направлены в противоположные стороны, трудно ожидать образования комплексов одного и того же типа с обеими субъединицами фермента при взаимодействии аналога с двумя активными центрами. Скорее всего комплекс с одной из субъединиц будет менее эффективным, чем с другой.

Для исследования характера взаимодействия бифункциональных аналогов АТР одновременно с двумя активными центрами димера были использованы химически активные бифункциональные соединения [76]:



Как рассматривалось выше, 2', 3'-диальдегидные производные АТР и АДР являются аффинными реагентами креатинкиназы. Они блокируют ε-аминогруппы остатков лизина вблизи рибофуранозилсвязывающих участков М- и М'-субъединиц димера креатинкиназы. Предполагалось, что 2',3'-диальдегидные бифункциональные соединения также будут модифицировать фермент в соответствии с критериями аффинной модификации. Исследование модификации фермента было проведено в условиях, в которых фермент находится в димерной форме. Согласно данным по ингибиции реакции, катализируемой креатинкиназой, производные ди-, тетра- и гептаметилендиаминов не способны взаимодействовать одновременно с двумя активными центрами фермента. В то же время производное триметилендиамина следовало рассматривать как потенциальный аффинный реагент для сшивки субъединиц функционального димера.

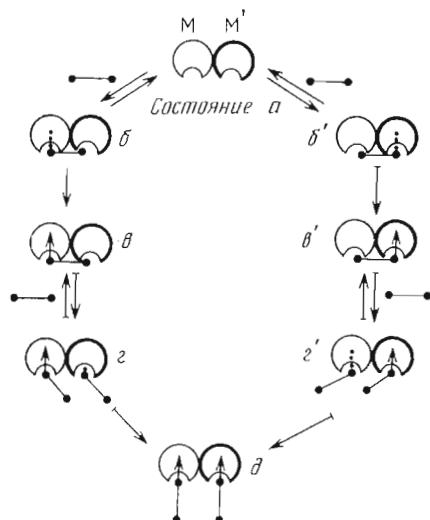
Было показано, что инкубация фермента с любым из указанных аналогов приводит к инактивации фермента. Полной инактивации фермента соответствует ковалентное присоединение 1,8–2,0 моль аналогов АТР на 1 моль фермента. Нуклеотидный субстрат (АДР) защищает фермент от инактивации и ковалентного присоединения реагентов, т. е. совокупность данных свидетельствует об аффинном характере модификации киназы этими аналогами.

Анализ инактивированных на 90–95% препаратов креатинкиназы электрофорезом в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия не выявил ковалентно сшитых субъединиц. Более детальное исследование модификации ММ'-фермента бис-2',3'-диальдегидными АТР-производными ди-, три-, тетра- и гептаметилендиаминов выявило следующие особенности. При обработке киназы аналогами, которые не способны взаимодействовать одновременно с двумя активными центрами ММ'-фермента, зависимости логарифма активности как М-, так и М'-субъ-

единиц от времени имели линейный характер. Это свидетельствовало о независимом протекании реакций модификации M- и M'-субъединиц в MM'-димере белка. В то же время зависимость логарифма остаточной активности M- либо M'-субъединиц от времени модификации фермента производным триметилендиамина была нелинейной. С увеличением времени инкубации с этим соединением наблюдалось уменьшение скорости инактивации субъединиц фермента.

На основании совокупности полученных данных для описания процесса аффинной модификации креатинкиназы аналогом Ado5' PPP-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NH-PPP5'Ado [76] предложена схема (схема 3):

Схема 3



Согласно этой схеме, образование комплексов M- и M'-субъединиц киназы с аналогом АТР (обозначено точками) происходит независимо (на схеме переход из состояния (a) в состояния (b) и (b')). Это приводит к размещению второго остатка молекулы реагента вблизи второго активного центра функционального димера (на схеме состояния (b) и (b')) . Образование обратимого комплекса фермента с второй молекулой реагента будет затруднено из-за частичного экранирования активных центров M- и M'-субъединиц фермента ковалентно связанным (обозначено стрелкой) бифункциональным аналогом АТР (состояния (g) и (g')), что соответствует переходу из состояния (b) в состояния (g), а из состояния (b') в состояния (g'). Иначе говоря, затруднен переход из состояния (g) в состояния (g'), из состояния (g') в состояния (g), а также образование ковалентной связи димера со второй молекулой реагента, т. е. затруднен переход из состояния (g) и (g') в состояния (d). Переход молекул из состояния (b) в состояния (g) происходит примерно в 1,5–2 раза быстрее, чем из состояния (b') в состояния (g'). Константы скорости модификации M- и M'-субъединиц, соответствующие этим переходам, оценены равными соответственно 0,05 и 0,12 мин<sup>-1</sup>. Образование полностью модифицированной формы фермента (d), по-видимому, лимитируется комплексообразованием функционального димера со второй молекулой бифункционального аналога, что приводит к выравниванию скоростей модификации M- и M'-субъединиц белка. Переходы из состояний (g) и (g') в состояния (d) характеризуются одной и той же величиной константы скорости модификации субъединиц – 0,02 мин<sup>-1</sup>.

Совокупность данных, полученных в работе [76], свидетельствовала об одновременном связывании био-АТР-производного триметилендиамина с двумя активными центрами фермента. Согласно данным о длине и углах связей, расстояние между атомами γ-фосфата в молекуле бифункционального АТР-производного триметилендиамина, предполагая линей-

ную структуру «мостиков» между двумя остатками аденоцина, было оценено равным 5–6 Å. Очевидно, что столь близкое расстояние между активными центрами в димере киназы (5–6 Å или даже меньше для изогнутой конформации аналога), меньшее, чем размеры субстратов (ADP и ATP), может приводить к стерическому экранированию активных центров фермента и, как следствие, к уменьшению активности димерной формы фермента по сравнению с мономерной.

В свете этих результатов представляет интерес анализ данных по модификации тиоловых групп креатинкиназы, расположенных вблизи активных центров фермента, различными объемными реагентами. Так, введение в молекулу киназы S—CH<sub>3</sub>-групп инактивирует белок на 80%, а образование S—CN-производного приводит только к 30%-ной инактивации [2, 8]. Возможно, что в димере активные центры фермента и соответственно SH-группы различных субъединиц оказываются сближенными, что уменьшает доступность одной из SH-групп после модификации первой объемным реагентом. Пока остается не до конца ясным, объясняется ли разница при модификации фермента разными по величине реагентами на SH-группы пространственным экранированием второй субъединицы или является следствием асимметричной укладки субъединиц, как это предполагается в работах [54–56].

## 5. Динамика взаимодействия креатинкиназы с субстратами. Анализ состояния аффинной метки в комплексе с ферментом

Использование аффинных реагентов представляет интерес для исследования динамики взаимодействия ферментов с субстратами и их аналогами. Информативные данные в этом случае могут быть получены при сравнении состояния аффинного реагента в комплексе с ферментом до и после его ковалентного присоединения к белку. Индикаторами, отражающими конформационное состояние аффинного реагента, могут быть его флуоресцентные группы. Анализ флуоресценции аффинных меток позволяет получить представление о конформационной подвижности исследуемого биополимера при взаимодействии с субстратами, оценить расстояние между его активными центрами. Кроме того, флуоресцентные метки позволяют регистрировать протекание катализируемой ферментом реакции [86–88].

В работе [9] для исследования динамики взаимодействия креатинкиназы с нуклеотидными и гуанидиновыми субстратами были предложены  $\gamma$ -n-азидоацетил-εATP (азидо-εATP) и  $\beta$ -n-азидоацетил-εADP (азидо-εADP). Перспективность применения таких аналогов нуклеотидов связана с особенностями их структуры [89]. Интенсивность флуоресценции этих соединений существенно меньше интенсивности флуоресценции исходных εADP и εATP (примерно в 20 раз) вследствие специфического взаимодействия между ароматической группировкой при концевом фосфате и этенированным основанием реагентов.

Квантовый выход флуоресценции азидореагентов увеличивается в 2–3 раза при разрушении «стекинг»-взаимодействия этих группировок аналогов, например при использовании 50%-ного этанола в качестве растворителя. Еще более сильно эффект возрастания интенсивности флуоресценции (в 4–5 раз) проявляется при взаимодействии аналогов с креатинкиназой, что позволяет контролировать этот процесс. Ковалентное присоединение азидо-εATP и азидо-εADP к киназе происходит в соответствии с требованиями к аффинным реагентам. Совокупность данных, полученных в работах [9, 39, 89], свидетельствует о том, что при облучении смеси креатинкиназы с этеноаналогами возрастание флуоресценции системы во времени связано с ковалентным присоединением метки только в нуклеотидсвязывающем участке белка. Образование ковалентных связей между реагентами и белком происходит вблизи активных центров креатинкиназы таким образом, что модифицированный фермент не может катализировать превращение субстратов (теряет активность), но способен связывать нуклеотиды, креатин и креатинфосфат. Ковалентно связанные с фермен-

том метки чувствительны к присутствию субстратов. Добавление к модифицированному ферменту ATP или ADP приводит к дополнительному увеличению флуоресценции метки [9, 39, 89]. С помощью кривой титрования фермента, модифицированного азидо- $\varepsilon$ ATP, были оценены величины  $K_d$  (30 и 350 мкМ) комплекса модифицированного фермента с ADP и ATP, которые практически не отличаются от величин для нативного белка, найденных при использовании флуоресцентного зонда — 2-толуидинонафталиен-6-сульфоната [39].

Таким образом, структурные особенности азидоанилидов  $\varepsilon$ ATP и  $\varepsilon$ ADP позволяют следить за процессом инактивации киназы этими реагентами одновременно как по изменению активности фермента, так и по увеличению свечения меток в процессе их ковалентного присоединения к белку.

Нарушение «внутреннего стекинга» в молекуле азидо- $\varepsilon$ ATP, ковалентно присоединенной к киназе, было исследовано с помощью эффекта тушения флуоресценции. Известно [9], что в результате экранирования этенированного основания в азидо- $\varepsilon$ ATP ароматической группой тушение флуоресценции этого аналога с помощью КI затруднено в 6 раз. Оказалось, что флуоресценция присоединенного к ферменту азидо- $\varepsilon$ ATP тушится практически так же, как  $\varepsilon$ ATP: величины констант Штерна — Фольмера тушения флуоресценции для  $\varepsilon$ ATP, азидо- $\varepsilon$ ATP и ковалентно связанных с белком азидо- $\varepsilon$ ATP найдены равными 120, 20 и 90 М<sup>-1</sup>. Спектр флуоресценции ковалентно присоединенной  $\varepsilon$ ATP-метки практически не отличался от такого для  $\varepsilon$ ATP. Отсутствие сдвига максимума флуоресценции метки на ферменте по сравнению со свободным состоянием в растворе свидетельствует в пользу доступности метки молекулам воды в активном центре фермента. Сильное тушение флуоресценции остатков триптофана киназы, модифицированной азидо- $\varepsilon$ ATP, позволяет предположить о переносе энергии с остатков триптофана на ковалентно присоединенную метку и указывает на возможную локализацию этих остатков вблизи активного центра фермента [9].

На основании совокупности рассмотренных данных можно предположить, что, несмотря на образование ковалентной связи между реагентом и ферментом, этенированное основание нуклеотидной метки может «выходить» из активного центра за счет большого размера спейсера между концевым  $\gamma$ -фосфатом метки и блокированным акцептором фермента при добавлении конкурентного лиганда ADP (или ATP). Принимая во внимание более высокое средство  $\varepsilon$ ATP по сравнению с ATP или ADP к ферменту, а также доступность этенированного основания метки молекулам КI и воды, следует полагать, что нарушение специфических контактов с белком и, как следствие, «выход» этенированного основания реагента из комплекса вряд ли обусловлены только эффектом конкуренции метки с добавленным ADP либо ATP. Скорее всего этенированное основание метки может находиться вне активного центра и в отсутствие конкурентного лиганда. Но существуя такая интерпретация данных основана на динамическом характере связывания лигандов с активными центрами фермента. Если предположить, что аналог субстрата способен образовывать несколько различных по своей топографии комплексов с активным центром фермента, то при наличии протяженного соединительного фрагмента между специфической частью реагента и его блокирующей группой, ковалентно связавшей с белком, метка в принципе может быть выведена из активного центра либо может образовать с ним комплекс другого типа.

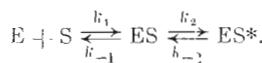
Другим объяснением разрушения комплекса специфической части метки с активным центром фермента может быть сохранение средства этенированного основания к ароматическому кольцу аналога даже после присоединения реагента к белку. При этом этенированное основание находится определенное время как в комплексе с ферментом, так и с ароматическим кольцом при  $\gamma$ -фосфате.

Совокупность данных указывает на принципиальную возможность (при наличии большого по размеру соединительного фрагмента между субстратной частью аналога и его химически активной группой) получения модифицированных форм фермента, которые либо полностью сохраняют

функциональную активность, либо способны, по крайней мере как и в рассматриваемом случае, связывать субстраты. В то же время результаты последовательной модификации креатинкиназы с помощью азидо- $\epsilon$ ADP и азидо- $\epsilon$ ATP (или в обратном порядке) показывают, что ковалентное присоединение одного из аналогов к ферменту исключает возможность присоединения второго реагента, что указывает на блокирование одного и того же либо близкого участка посредством обоих азидопроизводных [9].

Модифицированный с помощью азидо- $\epsilon$ ATP препарат креатинкиназы оказался удобным для оценки скоростей связывания субстратов методом остановленной струи [9]. Полученная зависимость скоростей связывания модифицированного фермента с ADP и ATP согласуется с предположением о наличии стадии изомеризации комплекса креатинкиназы с нуклеотидами [90] (схема 4).

*Схема 4*



В описываемом схемой процессе первая стадия (ассоциация) существенно быстрее второй (изомеризации комплекса). Были найдены следующие величины констант скоростей этих стадий для фермента, модифицированного азидо- $\epsilon$ ATP: для ADP  $k_{-2}$  20 с<sup>-1</sup>,  $k_2$  145 с<sup>-1</sup>,  $K_d(k_{-1}/k_1)$  45 мкМ; для ATP  $k_{-2}$  12 с<sup>-1</sup>,  $k_2$  40 с<sup>-1</sup>,  $K_d$  200 мкМ. Таким образом, константа скорости изомеризации комплекса фермента с ADP в 3 раза выше по сравнению с аналогичной величиной для ATP, что еще раз указывает на разницу во взаимодействии креатинкиназы с этими нуклеотидами. Креатин и креатинфосфат практически не влияют на сродство нуклеотидов к модифицированному азидо- $\epsilon$ ATP ферменту. В то же время их присутствие существенно оказывается на скорости изомеризации комплексов с нуклеотидами [9], что указывает на «сиnergизм» центров связывания нуклеотидов и гуанидиневых субстратов. Совокупность результатов отражает динамический характер взаимодействия креатинкиназы с субстратами. Не исключено, что на стадиях конформационной изомеризации реализуются различные специфические контакты нуклеотидов с белком, что в свою очередь может изменить характер аффинной модификации.

## 6. Множественность модификации аффинными реагентами как следствие динамического характера взаимодействия лигандов с белками

Удобными для анализа участка связывания трифосфатной цепи ATP в активном центре креатинкиназы представлялись фосфорилирующие аналоги нуклеотидов — их имидазолиды. С помощью имидазолидов ATP, GTP, GMP в активном центре ДНК-зависимой РНК-полимеразы из *E. coli* были локализованы остатки гистидина и лизина [23, 91, 92]. В работе [93] было показано, что  $\gamma$ -имидазолиды dATP, dGTP, dCTP являются аффинными реагентами ДНК-полимеразы I из *E. coli*.

Инкубация киназы с имидазолидами AMP, ADP и ATP приводила к инактивации фермента [77]. Зависимости логарифма остаточной активности M- и M'-субъединиц от времени инкубации с имидазолидами AMP, ADP и ATP при их различных концентрациях были линейными, что указывало на псевдодупервый порядок модификации. С помощью наблюдаемых зависимостей скоростей инактивации от концентрации имидазолидов ADP и ATP оценены величины  $K_d$  комплексов M-субъединицы киназы с этими реагентами, равные соответственно 7 и 2 мМ.

Добавление ATP и ADP в инкубационные смеси для инактивации фермента имидазолидами нуклеотидов приводило к снижению скоростей инактивации белка. При добавлении ATP и ADP в концентрациях, сравнимых с концентрациями реагентов, наблюдалось уменьшение скорости инактивации в 1,5–5 раз. Защитный эффект нуклеотидов возрастал с увеличением их концентрации. Эти данные свидетельствовали об аффинности модификации фермента имидазолидами нуклеотидов.

Инактивация фермента имидазолидами нуклеотидов в принципе могла быть обусловлена как фосфорилированием фермента, так и включением в белок остатка имидазола с образованием имидазолидов аспарагиновой или глутаминовой кислот. Предположение о наличии в нуклеотидсвязывающем участке креатинкиназы карбоксильных групп остатков глутаминовой либо аспарагиновой кислот выдвинуто в работе [94]. В случае фосфорилирования карбоксильных групп этих остатков имидазолидами нуклеотидов следовало ожидать образования смешанных ангидридов фосфорной и карбоновой кислот. Последние очень реакционноспособны и неустойчивы даже при нейтральных рН. При использовании имидазолидов AMP, ADP и ATP, содержащих метку в адениновом кольце, наблюдалось включение только 0,03–0,06 моль [ $^{14}\text{C}$ ] нуклеотидов на 1 моль димера при полной инактивации белка. Удаление избытка реагентов не влияло ни на глубину инактивации, ни на уровень модификации белка. Метка была достаточно стабильной при рН 6–10.

Для проверки альтернативного варианта – возможности включения остатка имидазола – был использован  $^3\text{H}$ -меченный аналог ADP, содержащий метку в имидазольном кольце. Включение имидазола в этом случае не превышало 0,01 моль на 1 моль белка. Следовательно, не наблюдалось соответствия между уровнем ковалентного включения метки и глубиной инактивации фермента при использовании аналогов, меченых как по нуклеотидной части, так и по имидазолу.

Возможным объяснением полученных данных могло быть образование промежуточных продуктов взаимодействия аналогов с аминокислотными остатками фермента, которые способны к последующим реакциям со сближенными группами белка, сопровождающимися удалением остатков реагента.

Взаимодействие любого из промежуточных соединений со стерически близкой группой белка можно затормозить добавлением реагентов, нарушающих эту пространственную сближенность. С этой целью модификацию креатинкиназы меченными по основанию или имидазолу реагентами останавливали добавлением денатурирующего агента – додецилсульфата натрия. Однако и в этих условиях полной инактивации фермента соответствовало присоединение 0,1–0,15 моль  $^{14}\text{C}$ -меченых нуклеотидов или 0,4 моль [ $^3\text{H}$ ] имидазола на 1 моль димера.

На основании этих данных было сделано предположение о том, что в ходе модификации фермента может иметь место как фосфорилирование белка, так и включение остатка имидазола. Однако и первая, и вторая метка отщепляются в процессе реакции инактивации. Отщепление этих меток возможно в случае образования смешанного ангидрида карбоновой и фосфорной кислот и ацилимида имидазола с последующим взаимодействием активированной карбоксильной группы со сближенным нуклеофилом. Для проверки такой возможности были исследованы изменения спектров киназы после ее полной модификации (95–100%) имидазолидами AMP, ADP и ATP. Во всех случаях было показано, что разностный спектр фермента, модифицированного имидазолидами нуклеотидов, соответствует спектру N,O-диацетилтирофиллина. Эти данные указывали на образование в активном центре фермента ацилтирофиллина в результате реакции активированной карбоксильной группы со сближенной с ней OH-группой остатка тирозина. Дополнительным подтверждением этого вывода явилось совпадение скоростей изменения поглощения растворов N,O-диацетилтирофиллина и модифицированных имидазолидами нуклеотидов препаратов фермента при их обработке гидроксиленом в одинаковых условиях. Стехиометрия образования сложноэфирной связи карбоксильной группы с OH-группой тирозина на ферменте была оценена равной  $2,1 \pm 0,2$  моль на 1 моль димера.

Наряду с образованием «внутримолекулярных сшивок» (ацилтирофиллин) имидазолиды нуклеотидов модифицируют киназу с образованием продуктов, стабильных при нейтральных и слабощелочных рН. Характер образуемых стабильных связей был проанализирован путем отщепления ковалентной метки в условиях денатурации белка согласно методу, предложенному в работах [23, 91, 92]. Кинетическая кривая отщепления метки от

Фермента, модифицированного имидазолидом АТР, соответствовала таковой для  $\gamma$ -N-метиламида АТР, что свидетельствовало о наличии  $\epsilon$ -аминогруппы остатка лизина в качестве акцептора  $\gamma$ -фосфата аналога АТР. В пользу размещения одного из остатков лизина вблизи  $\gamma$ -фосфата АТР свидетельствовали также данные работы [45], в которой с помощью ЯМР-спектроскопии показано, что  $\epsilon$ CH<sub>2</sub>-группа остатка лизина сближена с ферментом в комплексе, аналогичном переходному состоянию: киназа · MgADP · формиат · креатин.

Скорость гидролиза ковалентной связи модифицированного фермента в случае его инактивации имидазолидом АМР в наибольшей степени соответствовала скорости гидролиза фосфамидной связи АМР и гуанидиневой группы остатка аргинина. На основании этого было сделано предположение, что остаток аргинина расположен вблизи  $\gamma$ -фосфата АТР при образовании комплекса последнего с киназой и образует с ним электростатический контакт. Предположение о наличии важного для каталитической активности киназы остатка аргинина высказывалось и ранее на основании данных модификации фермента специфическими химическими реагентами [2, 8, 95].

Таким образом, в случае одного и того же реагента наблюдается образование двух типов ковалентных связей с белком: нестабильных, приводящих к промежуточным активированным соединениям, и стабильных — с остатками лизина и аргинина (соответственно в случае имидазолидов АТР и АМР). Узнавание субстрата ферментом обеспечивается, во-первых, многоточечными контактами, а во-вторых, динамическим изменением этих контактов в процессе формирования каталитически активного состояния. Как было указано выше, в случае креатинкиназы на многостадийное связывание нуклеотидов с ферментом может указывать существование двух стадий комплексообразования: ассоциации и более медленной изомеризации (см. схему 4) [9, 90]. Это создает предпосылки для формирования набора комплексов реакционноспособного аналога субстрата с активным центром фермента. Топография комплексов фермента с реакционноспособными аналогами может различаться. Это обстоятельство как бы обеспечивает «подвижность» реакционноспособной группы, т. е. разнообразие стерических возможностей для атаки аналогом групп биополимера. По-видимому, не все возможности ковалентного присоединения могут быть реализованы. Очевидно, что возможность образования ковалентной связи определяется как взаимной ориентацией реакционноспособной группы и аминокислотного акцептора, так и их относительной реакционной способностью. Аналогичные причины множественности аффинной модификации обсуждаются в обзоре [96].

Преимущественная модификация карбоксильной группы креатинкиназы по сравнению с модификацией остатков лизина или аргинина (соответственно в случае имидазолидов АТР или АМР) скорее всего определяется большей реакционной способностью карбоксильной группы. В условиях экспериментов по модификации киназы (рН 8,5) карбоксильные группы в отличие от аминогрупп остатков лизина или гуанидиневых групп остатков аргинина должны быть полностью депротонированы [77].

Множественность мечения наблюдалась и в случае других ферментов. Например, выявлено множественное мечение пептидов триптического гидролизата фенилаланил-тРНК — синтетазы из *E. coli*, модифицированной аналогом АТР [97]. Модификация панкреатической рибонуклеазы реакционноспособными аналогами динуклеотидов выявила несколько различных форм фермента, содержащих ковалентно присоединенный остаток реагента. При общей стехиометрии ковалентного присоединения реагента не выше 1 моль на 1 моль фермента получены формы, обладающие ферментативной активностью и лишенные активности [98, 99].

Альтернативной причиной множественного мечения фермента аффинным реагентом может быть наличие нескольких структурно подобных центров связывания реагента. Например, в случае аминоацил-тРНК — синтетаз было показано, что реакционноспособные аналоги АТР взаимо-

действуют с тРНК-узнающими участками фермента [42]. Аналоги нуклеотидов помимо активных центров могут блокировать нуклеотидзависимые эффекторные центры ферментов [100–102]. Однозначное объяснение причин множественного мечения в этих случаях представляется достаточно сложным [102]. В то же время дополнительное мечение такого типа скорее всего не имеет места для креатинкиназы, так как стехиометрия ковалентного присоединения реакционноспособных аналогов АТР и АДР во всех случаях соответствовала числу активных центров.

Таким образом, когда существуют доказательства направленности модификации определенных участков, аффинная модификация может быть использована для оценки динамики взаимодействия лигандов с ферментами.

Сложность процесса взаимодействия субстратов с активными центрами ферментов значительно изменяет принятые критерии аффинной модификации. В классической схеме аффинного мечения не учитывается вероятность множественности комплексов реакционноспособного лиганда с ферментом, вероятность их конформационной перестройки, а также кооперативного влияния связывания лигандов с разными активными центрами, что может быть причиной модификации нескольких разных аминокислотных акцепторов в пределах одного и того же активного центра. В том случае, если «узнающая» часть реагента после образования последним ковалентной связи с белком способна «покидать» активный центр, возможно полное или частичное сохранение активности модифицированного фермента, что также не укладывается в классические критерии аффинного мечения. Возможны ситуации, когда не наблюдается защитного эффекта природного лиганда от модификации аналогом, либо этот эффект значительно снижен [9, 16, 101].

В принципе не является бесспорной характеристикой аффинности реагента гиперболический характер зависимости начальной скорости модификации от концентрации реагента. Отклонения от этой зависимости уже были описаны при изучении аффинной модификации сложных многоцентровых систем [16, 26]. Кроме того, подобные зависимости зачастую наблюдаются для группоспецифических химических реагентов, по существу лишивших «аффинной» части, но в то же время обладающих сродством к определенным участкам фермента [42, 103]. Таким образом, полученные характеристики процесса аффинной модификации для реальных ферментативных систем далеко не всегда соответствуют простой схеме, предложенной ранее для его описания. В то же время выявленные несоответствия при детальном анализе системы иногда позволяют получить информацию о функционировании фермента, которая не может быть извлечена с помощью других методов.

## 7. Функционально важные остатки аминокислот активного центра креатинкиназы

Основными методами исследования функционально важных остатков креатинкиназы из скелетных мышц кролика до настоящего времени являлись химическая модификация группоспецифическими реагентами, аффинная модификация и ЯМР-спектроскопия. Поскольку к настоящему времени проведено определение первичной структуры этого белка [6], анализ результатов по выявлению существенных для активности аминокислотных остатков представляет особенный интерес.

В ряде работ на основании инактивации креатинкиназы при блокировании тиоловых групп фермента предполагалось, что эти группы входят в активный центр [1, 2, 8]. Тиоловые группы креатинкиназы модифицируются аффинным реагентом  $\gamma$ -*n*-азидоанилидом АТР [30]. Однако позже было установлено, что блокирование SH-групп белка можно провести с сохранением ферментативной активности [1, 2, 8]. Развитие представлений о роли тиоловых групп в функционировании фермента наглядно иллюстрирует сложность рассматриваемого вопроса. В настоящее время есть основания полагать, что тиоловые группы находятся вбли-

зи активного центра фермента, однако не принимают непосредственного участия ни в связывании, ни в катализическом превращении субстратов (см. раздел 4).

Данные ряда работ указывают на возможность взаимодействия оснований нуклеотидов с ароматическим кольцом остатка триптофана активного центра креатинкиназы. Так, модификация остатков триптофана (2-окси-нитробензил)сульфонилбромидом приводит к инактивации фермента. Добавление нуклеотидов предотвращает модификацию остатков триптофана и инактивацию фермента [104]. Сделанное предположение согласуется с данными работ [8, 105], в которых показано тушение флуоресценции триптофана при образовании комплексов фермента с нуклеотидами. Поскольку рассчитанное критическое ферстеровское расстояние для резонансного переноса энергии между триптофаном в креатинкиназе и аденином в ADP не превышает 5 Å, по меньшей мере один остаток триптофана должен находиться вблизи участка связывания цуринового основания. О локализации одного (или более) остатка триптофана вблизи аденинового кольца ADP сделан вывод на основании исследования комплекса фермента с нуклеотидом с помощью ЯМР-спектроскопии [105]. Об изменении спектров поглощения триптофана при связывании ферментом нуклеотида свидетельствуют данные работы [9].

Существование важных для активности остатков лизина было показано при модификации фермента дансилхлоридом [106]. ε-Аминогруппа одного из остатков лизина локализована вблизи рибофуранозильсвязывающего участка белка. Ее модификация (в обеих субъединицах киназы) достигается с помощью 2',3'-диальдегидных производных ATP и ADP [37, 76]. В работе [37] сделано предположение, что эта группа необходима для правильного связывания нуклеотида, но не принимает непосредственного участия в процессах переноса фосфорильного остатка между нуклеотидными и гуанидиниевыми субстратами. Не исключено участие ε-аминогруппы остатка лизина, расположенного вблизи рибофуранозного цикла, в ориентации полифосфатной цепи ATP относительно функциональных групп на катализических стадиях реакции [37].

Еще один остаток лизина локализован вблизи γ-фосфата ATP. В работе [45] методом ЯМР-спектроскопии показано, что εCH<sub>2</sub>-группа остатка лизина сближена с формиатом в комплексе переходного состояния: киназа·ADP·формиат·креатин. На основании величины скорости гидролиза фосфамидной связи между белком и реагентом, образованной в результате модификации креатинкиназы имидазолидом ATP, также сделано предположение о локализации ε-аминогруппы остатка лизина вблизи γ-фосфата нуклеотида [77].

Модификация креатинкиназы как бутандионом, так и фенилглиоксалем выявила один функционально важный остаток аргинина [2, 8, 95]. На основании данных по модификации креатинкиназы имидазолидом АМР в работе [77] сделано предположение, что нуклеотидный аналог модифицирует остаток аргинина. Положительно заряженная гуанидиниевая группа остатка аргинина, по-видимому, образует электростатический контакт с γ-фосфатом молекулы ATP. В пользу расположения остатка аргинина в нуклеотидсвязывающем участке креатинкиназы, возможно вблизи α-либо β-фосфата, свидетельствует также исследование комплекса фермента с ADP методом ЯМР-спектроскопии [105, 107].

Диэтилпирокарбонат модифицирует один функционально важный остаток гистидина креатинкиназы [108, 109]. Однако в активном центре креатинкиназы (или вблизи него) расположены, по-видимому, три остатка гистидина, что следует из данных ЯМР-спектроскопии [45]. Из зависимости химических сдвигов C2-протонов этих остатков от pH вытекает, что величины их рK составляют 7,0; 7,1 и 5,9 [45]. Значение рK одного из остатков гистидина (7,0) при насыщении фермента ATP увеличивается до 7,6–7,7. рK нуклеофильных групп киназы, найденных для M- и M'-субъединиц из зависимости скорости инактивации фермента γ-[N-метил-N-(2-хлорэтил)]амидом ATP от pH реакционной среды, совпадает с величиной рK гистидина (7,6–7,7) в присутствии нуклеотида. О локализации

модифицируемой труппы в участке связывания креатина говорит тот факт, что креатин эффективно защищает фермент от инактивации алкилирующим аналогом АТР [38]. Согласно данным работы [45], расстояние между С2-протоном остатка гистидина и атома хрома в комплексе  $\text{Cr}^{3+}\cdot\text{ATP}$  с креатинкиназой составляет 11,5 Å. Возможно, что при взаимодействии фермента с  $\gamma$ -[N-метил-N-(2-хлорэтил)]амидом АТР нуклеофильный атом азота остатка гистидина атакует положительно заряженный атом углерода

$\text{CH}_2-\text{Cl}$ -группы аналога, что сопровождается алкилированием функционально важного остатка гистидина креатинкиназы. Этот остаток гистидина, согласно работам [2, 8, 45], может выполнять роль общего кислотно-основного катализатора, депротонирующего гуанидиниевую группу креатина при фосфорилировании последнего Mg·АТР.

В активном центре креатинкиназы, по-видимому, присутствует несколько остатков дикарбоновых кислот. Существование карбоксильной группы с р<sub>K</sub> 6, участвующей в связывании креатина, постулируется на основании pH-зависимости конкурентного влияния креатина на связывание с ферментом креатинфосфата в присутствии насыщающих концентраций Mg·ADP [110]. О локализации карбоксильной группы в участке связывания креатина свидетельствуют также данные по модификации фермента эпоксикреатином с образованием сложноэфирной связи между реагентом и белком [8]. Креатинкиназа из скелетных мышц кролика подвергается модификации по карбоксильным группам остатков аспарагиновой или глутаминовой кислот водорастворимым карбодимиидом [94]. Необходимо отметить, что от инактивации карбодимиидом фермент эффективно защищают аналоги нуклеотидов, но не креатин или креатинфосфат. Последнее указывает на локализацию остатков глутаминовой или аспарагиновой кислот в участке связывания нуклеотидных субстратов.

Как было рассмотрено выше, имидазолиды AMP, ADP и АТР модифицируют фермент с образованием смешанных ангидридов фосфорной и карбоновой кислот и ацилимида с последующим взаимодействием карбоксильной группы со сближенной OH-группой остатка тирозина. В конечном итоге образуется сложноэфирная связь между остатками тирозина и карбоксильной группой белка [77]. Эти данные также говорят о расположении карбоксильных групп вблизи трифосфатсвязывающего участка фермента. На основании анализа скоростей инактивации M-, M'-субъединиц креатинкиназы имидазолидами AMP, ADP и АТР в работе [77] сделано предположение, что вблизи трифосфатсвязывающего участка белка локализована не одна, а несколько карбоксильных групп. По-видимому, эти карбоксильные группы необходимы для координирования в активном центре белка иона  $\text{Mg}^{2+}$ .

На функциональную важность остатка тирозина могут указывать данные инактивации фермента соответствующими группоспецифическими реагентами [2, 111]. О локализации остатка тирозина вблизи участка связывания полифосфатной цепи нуклеотидов может свидетельствовать образование сложноэфирной связи между карбоксильными группами фермента и OH-группой сближенного тирозина при модификации фермента имидазолидами нуклеотидов [77].

## Заключение

В данном обзоре рассмотрены последние данные изучения креатинкиназы с помощью аффинной модификации реакционноспособными аналогами ADP и АТР. Анализ полученных результатов, на наш взгляд, демонстрирует новые перспективы этого подхода в исследовании как креатинкиназы, так и других олигомерных ферментов.

Помимо локализации аминокислотных остатков активного центра и размещения активных центров на субъединицах олигомерных ферментов метод аффинной модификации позволяет выявить: а) множественность комплексов фермента с субстратом, являющуюся отражением динамического характера взаимодействия субстрата с активным центром; б) кооперативные взаимодействия активных центров многосубстратных фермен-

тов; в) неэквивалентность активных центров функциональных димеров и причины, ее вызывающие; г) стерическое экранирование активных центров при образовании олигомеров фермента.

Следовательно, может быть получена информация, труднодоступная при использовании других подходов. Особенно перспективно применение метода аффинной модификации для решения функциональных задач в сочетании с рентгеноструктурным анализом и «сайт-направленным» мутагенезом.

Значительная часть собственных экспериментальных данных, рассматриваемых в обзоре, получена в совместных работах с лабораторией энзимологии Института экспериментальной биологии Академии наук АрмССР, проведенных совместно с Ж. И. Акопяном, М. Г. Газарянц, З. С. Мкртчян, Л. С. Нерсесовой.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Watts D. C. // The Enzymes / Ed. Boyer P. D. N. Y.: Acad. Press, 1977. V. 8. P. 383–455.
2. Bickerstaff G. F., Price N. C. // Int. J. Biochem. 1978. V. 9. № 1. P. 1–8.
3. Williamson J., Greene J., Cherif S., Milner-White E. J. // Biochem. J. 1977. V. 167. № 3. P. 731–737.
4. Yue R. H., Palmieri P. H., Olson O. E., Kuby S. A. // Biochemistry. 1967. V. 6. № 10. P. 3204–3227.
5. Chequwiden W. R., Hewet-Emmett D., Penny G. G. // Int. J. Biochem. 1985. V. 17. № 6. P. 749–752.
6. Putney S., Herlihy W., Royal N., Pang H., Aposhian H. V., Pickering L., Belagaje R., Biemann K., Page D., Kuby S., Schimmel P. // J. Biol. Chem. 1984. V. 259. № 23. P. 14317–14320.
7. Morrison J. F., James E. // Biochem. J. 1965. V. 97. № 1. P. 37–52.
8. Kenyon G. L., Reed G. H. // Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology / Ed. Mclester A. New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore: John Wiley & Sons, 1983. V. 54. P. 367–426.
9. Денисов А. Ю., Невинский Г. А., Лаврик О. И. // Биоорган. химия. 1982. Т. 8. № 1. С. 72–79.
10. Milner-White E. J., Watts D. C. // Biochem. J. 1971. V. 122. № 5. P. 727–740.
11. Нерсесова Л. С., Акопян Ж. И. // Биол. журн. Армении. 1983. Т. 36. № 10. С. 809–818.
12. Нерсесова Л. С., Мкртчян З. С., Газарянц М. Г., Акопян Ж. И. // Биол. журн. Армении. 1984. Т. 37. № 4. С. 309–316.
13. Мкртчян З. С., Газарянц М. Г., Акопян Ж. И. // Биол. журн. Армении. 1984. Т. 37. № 12. С. 1005–1010.
14. Кочетков С. П., Габибов А. Г., Северин Е. С. // Биоорган. химия. 1984. Т. 10. № 10. С. 1301–1325.
15. Baker B. R. Design of active-site directed irreversible enzyme inhibitors. N. Y.: John Wiley and Sons, 1967. P. 156–191.
16. Аффинная модификация биополимеров / Ред. Кнорре Д. Г. Новосибирск: Наука, 1983. С. 86–111.
17. Methods in Enzymology / Eds Colowick S. P., Kaplan N. O. N. Y.: Acad. Press, 1977. V. 46.
18. Theory and practice in affinity techniques / Eds Sundaram P. V., Eckstein F. London, New York, San Francisco: Acad. Press, 1978.
19. Plapp B. V. // Contemporary enzyme kinetics and mechanism / Ed. Purich D. L. N. Y.: Acad. Press, 1983. P. 321–351.
20. Киселев Л. Л., Фаирова О. О., Лаврик О. И. Биосинтез белков от аминокислот до аминоацил-tРНК / Ред. Кнорре Д. Г. М.: Наука, 1984. С. 71–104.
21. Belikova A. M., Zarylova V. F., Grineva N. I. // Tetrahedron Lett. 1967. № 37. P. 3557–3562.
22. Rando R. R. // Theory and practice in affinity techniques / Eds Sundaram P. V., Eckstein F. London, New York, San Francisco: Acad. Press, 1978. P. 135–150.
23. Grachev M. A., Mustaev A. A. // FEBS Lett. 1982. V. 137. № 1. P. 89–94.
24. Горшкова И. И., Лаврик О. И. // Молекулярн. биология. 1975. Т. 9. № 6. С. 887–891.
25. Gorshkova I. I., Lavrik O. I. // FEBS Lett. 1975. V. 52. № 1. P. 135–138.
26. Горшкова И. И., Лаврик О. И. // Молекулярн. биология. 1982. Т. 16. Вып. 5. С. 984–990.
27. Knorre D. G., Lavrik O. I. // Theory and practice in affinity techniques / Eds Sundaram P. V., Eckstein F. London, New York, San Francisco: Acad. Press, 1978, P. 169–188.
28. Marletta M. A., Kenyon G. L. // J. Biol. Chem. 1979. V. 254. № 6. P. 1879–1886.
29. Газарянц М. Г., Мкртчян З. С., Нерсесова Л. С., Курбагов В. А., Кнорре Д. Г., Акопян Ж. И. // Докл. АН АрмССР. 1978. Т. 66. № 3. С. 160–163.
30. Vandest P., Laabe J.-P., Kassab R. // Eur. J. Biochem. 1980. V. 104. № 2. P. 433–442.

31. Акопян Ж. И., Газарянц М. Г., Мкртчян З. С., Нерсесова Л. С., Лаврик О. И. // Биохимия. 1981. Т. 46. Вып. 2. С. 262–268.
32. Knorre D. G., Kurbatov V. A., Samukov V. V. // FEBS Lett. 1976. V. 70. № 1. Р. 105–108.
33. Badashkeeva A. C., Gall T. S., Efimova E. V., Knorre D. G., Lebedev A. V., Myzina C. D. // FEBS Lett. 1985. V. 155. № 1. Р. 263–266.
34. Бадашкеева А. Г., Галль Т. С., Кнорре Д. Г., Лебедев А. В., Ефимова Е. В., Мизина С. Д. // Биоорганическая химия. 1984. Т. 10. № 5. С. 696–701.
35. Nevinsky G. A., Ankilova V. N., Lavrik O. I., Mkrtchyan Z. S., Nersesova L. S., Akopyan J. I. // FEBS Lett. 1982. V. 149. № 1. Р. 36–40.
36. Невинский Г. А., Анкилова В. Н., Лаврик О. И., Мкртчян З. С., Нерсесова Л. С., Акопян Ж. И. // Биохимия. 1983. Т. 48. Вып. 2. С. 339–349.
37. Невинский Г. А., Газарянц М. Г., Мкртчян З. С. // Биоорганическая химия. 1983. Т. 9. № 4. С. 487–495.
38. Невинский Г. А., Газарянц М. Г., Лаврик О. И. // Биоорганическая химия. 1984. Т. 10. № 5. С. 656–665.
39. Денисов А. Ю., Невинский Г. А.. Лаврик О. И. // Биохимия. 1982. Т. 47. Вып. 2. С. 184–190.
40. Наградова Н. К. // Биохимия. 1977. Т. 42. № 3. С. 379–395.
41. Dallochio F., Negrini R., Signorini M., Rippa H. // Biochim. et biophys. acta. 1976. № 429. № 3. Р. 629–634.
42. Горшкова И. И., Дацай И. И., Лаврик О. И., Невинский Г. А. // Биохимия. 1981. Т. 46. Вып. 4. С. 699–707.
43. Mehler A. H., Kim J.-J. P., Olsen A. A. // Arch. Biochem. and Biophys. 1981. V. 212. № 2. Р. 475–482.
44. Грачев М. А., Мусаев А. А., Курбагов В. А., Сазонов И. Т., Сафропов И. В. // Биоорганическая химия. 1984. Т. 10. № 11. С. 1525–1534.
45. Rosecar P. R., Desmeules P., Kenyon G. L., Mildvan A. S. // Biochemistry. 1981. V. 20. № 21. Р. 6155–6164.
46. Mildvan A. S. // Phil. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B. 1981. V. 293. № 1063. Р. 65–74.
47. Фертиг Э. Структура и механизм действия ферментов. М.: Мир, 1980. С. 37, 160, 167.
48. Буцева В. Н., Горшкова И. И., Лаврик О. И., Мусаев А. А., Попов Р. А. // Молекулярная биология. 1980. Т. 14. № 6. С. 1308–1312.
49. Горшкова И. И., Лаврик О. И., Попов Р. А. // Биохимия. 1981. Т. 46. № 9. С. 1564–1569.
50. McLaughlin A. C. // J. Biol. Chem. 1974. V. 249. № 5. Р. 1445–1452.
51. Price N. C., Hunter M. G. // Biochim. et biophys. acta. 1976. V. 445. № 2. Р. 364–376.
52. Milner-White E. G., Kelly I. D. // Biochem. J. 1976. V. 157. № 1. Р. 23–31.
53. Price N. C. // Biochem. Soc. Trans. 1977. V. 5. Р. 764, 765.
54. Degani Y., Degani Ch. // Biochemistry. 1979. V. 18. № 26. Р. 5917–5923.
55. Degani Ch., Degani Y. // J. Biol. Chem. 1980. V. 255. № 17. Р. 8221–8228.
56. Degani Y., Degani Ch. // Trends. Biochem. Sci. 1980. V. 5. № 12. Р. 337–341.
57. Steitz T. A., Fletterick J. E., Anderson W. F., Anderson C. M. // J. Mol. Biol. 1976. V. 104. № 2. Р. 197–222.
58. Knowles J. R. // Annu. Rev. Biochem. 1980. V. 49. Р. 877–919.
59. Lazdunsky M. // Current topics in cellular regulation/Ed. Horecker B. L., Stadtman E. R. N. Y.–L.: Acad. Press. 1972. V. 6. Р. 267–311.
60. Levitzki A., Stallicup W. B., Koshland D. E. // Biochemistry. 1977. V. 10. № 18. Р. 5650–5652.
61. Krauss G., Pingoud A., Boehme D., Riesner D., Peters F., Maass C. // Eur. J. Biochem. 1975. V. 55. № 3. Р. 517–529.
62. Lazdunsky M., Petitclerc C., Chappelet D., Lazdunski C. // Eur. J. Biochem. 1971. V. 20. № 1. Р. 124–139.
63. Harada K., Wolfe R. G. // J. Biol. Chem. 1968. V. 243. № 15. Р. 4131–4137.
64. Fersht A. R., Mulvey R. S., Koch G. L. E. // Biochemistry. 1975. V. 14. № 1. Р. 13–18.
65. Fersht A. // Biochemistry. 1975. V. 14. № 1. Р. 5–12.
66. Bosshard H. R., Koch G. L. E., Hartley B. S. // Eur. J. Biochem. 1975. V. 53. № 2. Р. 493–498.
67. Irwin M. J., Nyborg J., Reed B. R., Blow D. M. // J. Mol. Biol. 1976. V. 105. № 4. Р. 577–586.
68. Cattan A. K., Jamieson J. M., Milner-White E. J., Price N. C. // Biochem. Soc. Trans. 1978. V. 6. № 1. Р. 220.
69. Takasawa T., Onodera M., Shiokawa H. // J. Biochem. 1983. V. 93. № 2. Р. 389–395.
70. Wevers R. A., Wolters R. J., Soons J. B. // J. Clin. chim. acta. 1977. V. 78. № 2. Р. 271–276.
71. Milner-White E. J. // Biochem. Soc. Trans. 1982. V. 10. № 2. Р. 107.
72. Falter H., Mickelutti I., Mazzuchini A., Whiston W. // Clin. Biochem. 1982. V. 15. № 4. Р. 200–205.
73. Akhverdyan V. Z., Kisseelev L. L., Knorre D. G., Lavrik O. I., Nevinsky G. A. // J. Mol. Biol. 1977. V. 113. № 4. Р. 475–501.
74. Анкилова В. Н., Горшкова И. И., Кононова Т. А., Лаврик О. И., Ходырева С. Н. // Молекулярная биология. 1972. Т. 12. Вып. 5. С. 1085–1095.
75. Боршик И. Б., Склянкина В. А., Абаева С. М. // Биоорганическая химия. 1985. Т. 11. № 6. С. 778–789.
76. Невинский Г. А., Воронушина Н. А., Булычев Н. В., Ковалева Г. К., Лаврик О. И. // Молекулярная биология. 1985. Т. 19. Вып. 2. С. 467–477.

77. Невинский Г. А., Лаврик О. И., Газарянц М. Г., Мергчан З. С., Акопян Ж. И. // Биоорган. химия. 1987. Т. 13. № 4. С. 506–518.
78. Bickerstaff G. F., Price N. C. // FEBS Lett. 1976. V. 64. № 2. P. 319–322.
79. Розанова Н. А., Четверикова Е. П. // Биохимия. 1981. Т. 46. № 12. С. 2125–2195.
80. Курганов Б. И. Аллостерические ферменты. М.: Наука, 1978. С. 117–174.
81. Егоров В. В., Захарычева А. В., Ананченко С. Н. // Биохимия. 1970. Т. 35. С. 895–900.
82. Силонова В. Г., Курганов Б. И. // Молекулярн. биология. 1970. Т. 4. № 3. С. 44–457.
83. Наградова Н. К., Ашмарина Л. И., Головина Т. О., Иванов М. В., Муронец В. И. // Физико-химические проблемы ферментативного катализа. М.: Наука, 1984. С. 141–147.
84. Доброиракова О. В., Зыков С. А., Мустаев А. А., Невинский Г. А. // Биоорган. химия. 1982. Т. 8. № 10. С. 1349–1357.
85. Невинский Г. А., Зыков С. А., Лаврик О. И. // Биоорган. химия. 1983. Т. 9. № 5. С. 641–647.
86. Доброецов Г. Е. // Молекулярн. биология. М.: ВИНИТИ, 1975. Т. 6. С. 34–104.
87. Доброецов Г. Е. // Биофизика. М.: ВИНИТИ, 1975. Т. 4. С. 86–132.
88. Геодзес Р. И., Котельников А. И., Пивоваров А. П., Садков А. П., Кост А. А. // Биоорган. химия. 1975. Т. 1. № 8. С. 1207–1214.
89. Невинский Г. А., Денисов А. Ю. // Биоорган. химия. 1981. Т. 7. № 11. С. 1693–1700.
90. Hammes C. J., Herst J. K. // Biochemistry. 1969. V. 8. № 3. P. 1083–1094.
91. Грачев М. А., Лухтанов Е. А., Мустаев А. А. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 8. С. 1079–1087.
92. Грачев М. А., Мустаев А. А., Колочева Т. И. // Докл. АН СССР. 1985. Т. 281. № 3. С. 723–727.
93. Невинский Г. А., Доронин С. В., Лаврик О. И. // Биополимеры и клетка. 1985. Т. 1. № 5. С. 247–253.
94. Невинский Г. А., Газарянц М. Г. // Биоорган. химия. 1987. Т. 13. № 4. С. 498–505.
95. Borders Ir. C. L., Riordan J. F. // Biochemistry. 1975. V. 14. № 21. P. 4699–4704.
96. Кнорре Д. Г., Власов В. В. // Успехи химии. 1985. Т. 54. № 9. С. 1420–1447.
97. Ходырева С. Н., Сычева Е. И., Анникова В. И., Лаврик О. И. // Молекулярн. биология. 1984. Т. 18. Вып. 5. С. 1316–1319.
98. Барам Г. И., Бунева В. И., Добрикова Е. Ю., Петров В. И. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 5. С. 613–620.
99. Бунева В. И., Годовикова Т. С., Зарытова В. Ф. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 7. С. 906–910.
100. Невинский Г. А., Лаврик О. И., Фаворова О. О., Киселев Л. Л. // Биоорган. химия. 1970. Т. 5. № 3. С. 352–364.
101. Лаврик О. И., Невинский Г. А., Рязанкин И. А. // Молекулярн. биология. 1979. Т. 13. Вып. 5. С. 1001–1010.
102. Горюкова И. И., Костикова И. В., Лаврик О. И., Мустаев А. А. // Изв. СО АН СССР. Сер. хим. 1984. Вып. 4. С. 93–99.
103. Philips M., Pradel L.-A. // Biochim. et biophys. acta. 1979. V. 566. № 2. P. 296–304.
104. Zhou H.-M., Tsou Ch.-L. // Biochim. et biophys. acta. 1985. V. 830. № 1. P. 59–63.
105. Vasak M., Nagayama K., Wüthrich K., Mertens M. L., Kägi J. H. R. // Biochemistry. 1979. V. 18. № 23. P. 5050–5055.
106. Kassab R., Roustan C., Pradel L.-A. // Biochim. et biophys. acta. 1968. V. 167. № 2. B. 308–316.
107. James T. L. // Biochemistry. 1976. V. 15. № 21. P. 4724–4730.
108. Pradel L. A., Kassab P. // Biochim. et biophys. acta. 1968. V. 167. № 2. P. 317–325.
109. Clarke D. E., Price N. C. // Biochem. J. 1979. V. 181. P. 467.
110. Cook P. F., Kenyon G. L., Cleland W. W. // Biochemistry. 1981. V. 20. № 5. P. 1204–1210.
111. Fattoum A., Kassab R., Pradel L.-A. // Biochim. et biophys. acta. 1975. V. 405. № 2. P. 324–339.

Поступила в редакцию  
26.II.1986  
После доработки  
10.VIII.1986

## ANALYSIS OF THE STRUCTURE AND FUNCTION OF ACTIVE SITES OF CREATINE KINASE BY AFFINITY LABELLING

LAVRIK O. I., NEVINSKY G. A.  
Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry,  
Siberian Division of the Academy of Sciences  
of the USSR, Novosibirsk

Data of studies of creatine kinase from rabbit skeletal muscle (EC 2.7.3.2) by affinity labelling and affinity chromatography are reviewed. Efficiencies of these techniques are demonstrated for analysis of cooperative interactions of the enzyme's active sites, nature of non-equivalence of enzyme subunits, distances between active sites which are situated on different subunits, dynamics of enzyme-substrate interactions and usefulness of affinity labelling for localization of amino acid residues in the enzyme active sites.