



УДК 577.152.611*20.042

ВЛИЯНИЕ ДИАДЕНОЗИНОЛИГОФOSФАТОВ (Ar_2A И Ar_3A) И ИХ FOSFONATНЫХ АНАЛОГОВ НА КАТАЛИТИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ ФЕНИЛАЛАНИЛ-тРНК-СИНТЕТАЗЫ ИЗ *E. coli**Бирюков А. П., Захарова О. Д.*, Лаврик О. И.**

*Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва;
* Новосибирский институт биоорганической химии Сибирского
отделения Академии наук СССР*

Исследовано влияние P^1, P^3 -бис(5'-аденозил) трифосфата (Ar_2A), P^1, P^4 -бис(5'-аденозил) тетрафосфата (Ar_4A) и фосфонатных аналогов Ar_4A , содержащих остаток метилendioсфононой кислоты в различных положениях полифосфатной цепи, на реакцию обмена АТР — $[^{32}P]PP_i$ и аминоацилирования тРНК, катализируемые фенилаланил-тРНК-синтетазой из *E. coli* MRE-600. Ar_2A и Ar_4A , а также их фосфонатные аналоги не оказывали заметного влияния на скорость обмена АТР — $[^{32}P]PP_i$ и не поддерживали его в отсутствие АТР. Диаденозилигофосфаты ингибировали аминоацилирование тРНК фенилаланином неконкурентно по отношению к АТР (K_i для Ar_4A равна 1,45 мМ). Наблюдалось ингибирование фосфонатными аналогами Ar_4A синтеза Ar_3A , зависящее от структуры аналогов. Сделан вывод об отсутствии эффективного взаимодействия фенилаланил-тРНК-синтетазы из *E. coli* с Ar_4A и его фосфонатными аналогами.

Ряд аминоацил-тРНК-синтетаз (КФ 6.1.1.x) из различных источников способен эффективно синтезировать диаденозилигофосфаты: P^1, P^3 -бис(5'-аденозил) трифосфат и P^1, P^4 -бис(5'-аденозил) тетрафосфат (Ar_2A и Ar_4A соответственно) [1]. Синтез Ar_2A и Ar_4A осуществляется с участием аминоациладенилата, промежуточного соединения реакции аминоацилирования тРНК, путем переноса активированного в нем остатка АМР на АДФ либо на АТР. Реакции синтеза диаденозилигофосфатов стимулируются ионами Zn^{2+} [1–3].

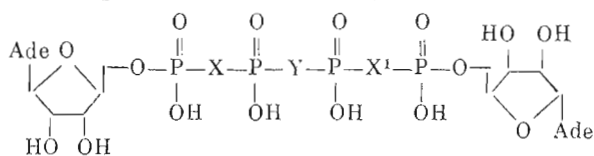
Как полагают, диаденозилигофосфаты могут выполнять роль клеточных регуляторов. Основанием для таких предположений служит ряд экспериментальных данных. Уровень Ar_4A в клетках варьирует в зависимости от пролиферативной активности тканей [4] или клеточного цикла [5]. Ar_4A может участвовать в качестве праймера в синтезе ДНК [4]. Стимуляция синтеза ДНК наблюдается при инъекции Ar_4A в ооциты *Xenopus laevis* [6]. Ar_2A и Ar_4A накапливаются в клетках, находящихся в состоянии стресса [7, 8].

Согласно работе [9], Ar_4A обладает достаточно высоким сродством к лизил-тРНК-синтетазе ($K_i = 2,5$ мкМ) и является ингибитором реакции аминоацилирования тРНК^{Lys}, конкурентным по отношению к АТР. Лизил-тРНК-синтетаза относится к типу аминоацил-тРНК-синтетаз, способных катализировать синтез Ar_4A и Ar_3A .

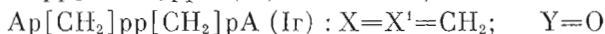
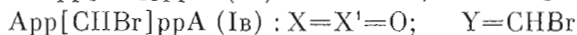
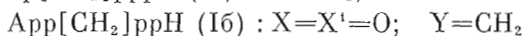
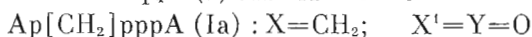
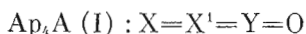
Поскольку фенилаланил-тРНК-синтетаза из *E. coli* также относится к ферментам, катализирующим в определенных условиях синтез Ar_4A и Ar_3A , представляется интересным проанализировать влияние этих соединений как на основные каталитические функции этого фермента, так и на синтез с его помощью диаденозилигофосфатов. При участии последних, возможно, осуществляется регуляция активности аминоацил-тРНК-синтетаз, которые выполняют также роль Ar_4A -связывающих белков.

Динуклеозидолигофосфаты являются метаболически нестабильными соединениями и могут расщепляться специфическими ферментами по фосфоангидридным связям между атомами P^1 и P^2 либо P^2 и P^3 [10]. По-видимому, именно поэтому внутриклеточная концентрация Ar_3A

и Ar_4A неустойчива и довольно низка (0,01–20 мкМ) [11]. Для изучения биологической роли динуклеозидолигофосфатов перспективно применение таких их аналогов, фосфоангидридные связи и полифосфатные цепи которых устойчивы к ферментативному гидролизу. В качестве подобных соединений могут быть предложены фосфонатные аналоги Ar_4A (I), синтез которых опубликован недавно [12, 13].



(I)



В настоящей работе изучено влияние этих соединений, а также Ar_4A и Ar_3A на реакции активации фенилаланина, аминоацилирования $tRNA^{Phe}$ и синтеза диаденозиолигофосфатов, катализируемые фенилаланил- $tRNA$ -синтетазой (КФ 6.1.1.20) из *E. coli* MRE-600.

В реакции активации фенилаланина Ar_3A и Ar_4A в концентрации 1 мМ не оказывали заметного действия на скорость обмена $ATP - [^{32}P]PP_i$ и не поддерживали его в отсутствие ATP . Аналоги Ar_4A (табл. 1), за исключением соединения (Iг), в той же концентрации практически не влияли на глубину обмена $ATP - [^{32}P]PP_i$. С аналогом (Iг) наблюдалось определенное увеличение скорости обмена $ATP - [^{32}P]PP_i$. Отсутствие средства фермента к Ar_3A и Ar_4A и его аналогом может быть вызвано рядом причин, обсуждаемых ниже. Однако это, вероятно, не связано с наличием высокой концентрации к реакционной смеси PP_i и ATP , поскольку уменьшение концентрации PP_i на 2 порядка, а ATP наполовину не вызвали влияния Ar_4A и его аналогов на реакцию обмена. Полученные данные свидетельствуют об отсутствии конкуренции аналогов за места связывания на ферменте PP_i и ATP .

Как известно, фенилаланил- $tRNA$ -синтетаза относится к группе синтетаз, способных катализировать обмен $ATP - [^{32}P]PP_i$ в отсутствие $tRNA$, в отличие от других синтетаз, катализирующих эту реакцию только в присутствии $tRNA$. В то же время не исключено влияние $tRNA$ как аллостерического эффектора на взаимодействие аминокислот-синтетаз с субстратами и ингибиторами реакции активации аминокислоты. В нашем случае добавление $tRNA$ (2 мг/мл) не приводило к изменению скорости реакции обмена $ATP - [^{32}P]PP_i$ и не вызывало ингибирования этой реакции как диаденозиолигофосфатами, так и фосфонатными аналогами Ar_4A (I).

В реакции аминоацилирования $tRNA^{Phe}$ диаденозиолигофосфаты не заменяли ATP , но снижали скорость аминоацилирования вдвое при концентрации 1 мМ. При этом было показано, что Ar_4A является неконкурентным ингибитором реакции по отношению к ATP . Аналогичные результаты получены и с аналогами (I). Неконкурентный тип торможения (рис. 1) и довольно низкое сродство (K_i для $Ar_4A = 1,45$ мМ) могут быть объяснены тем, что Ar_4A и его фосфонатные аналоги взаимодействуют с ферментом скорее всего в участке, отличающемся от центра связывания ATP . Вместе с тем не исключена конкуренция с $tRNA$, особенно при высоких концентрациях аналогов. Полученные результаты не согласуются с данными для лизил- $tRNA$ -синтетазы, поскольку в этом случае было обнаружено достаточно высокое сродство Ar_4A к ферменту (см. выше) и конкурентный в отношении ATP характер торможения реакции аминоацилирования $tRNA$ [9].

Влияние Ar_3A , Ar_4A и его аналогов на начальную скорость реакции обмена АТФ — $[^{32}P]PP_i$, катализируемый фенилаланил-тРНК-синтетазой из *E. coli* MRE-600

Соединения	Активность фермента *, % относительно контроля при концентрации соединений	
	0,5 мМ	1 мМ
Ar_3A	100	95
Ar_4A	100	90
$App[CH_2]ppA$	100	80
$App[CHBr]ppA$	100	78
$Ap[CH_2]pp[CH_2]pA$	300	135
$Ap[CH_2]pppA$	100	85

* Средняя величина из четырех опытов.

Таблица 2

Влияние аналогов Ar_4A на синтез Ar_3A , катализируемый фенилаланил-тРНК-синтетазой из *E. coli* MRE-600

Соединения (концентрация 5 мМ)	Активность фермента *, % относительно контроля
$App[CH_2]ppA$	33
$App[CHBr]ppA$	78
$Ap[CH_2]pppA$	90
$Ap[CH_2]pp[CH_2]pA$	120

* Средняя величина из трех опытов.

Как уже указывалось выше, ряд аминоксил-тРНК-синтетаз, в том числе фенилаланил-тРНК-синтетаза, особенно эффективно катализирует образование Ar_3A и Ar_4A в присутствии ионов цинка и пирофосфатазы. Достоверно показано, что механизм образования диаденозинполифосфатов включает взаимодействие аминоксиладенилата с АТФ либо АДФ [14, 15]. Однако для лизил-тРНК-синтетазы из печени крыс выявлена возможность синтетаз Ar_4A в отсутствие лизина, но в присутствии АМР [9]. Возможность подобного пути образования диаденозинполифосфатов была нами проверена для фенилаланил-тРНК-синтетазы. Оказалось, что в отсутствие фенилаланина ферментативный синтез Ar_3A и Ar_4A практически отсутствовал, что свидетельствует в пользу обязательности образования фенилаланиладенилата при ферментативном синтезе диаденозинполифосфатов в этой системе.

Ферментативный синтез диаденозинполифосфатов обычно проводят в присутствии ионов цинка. В связи с этим нам казалось целесообразным уточнить влияние $ZnCl_2$ на синтез Ar_4A и Ar_3A , катализируемый фенилаланил-тРНК-синтетазой. Оказалось (рис. 2), что максимальная скорость синтеза Ar_4A достигается при 40 мкМ $ZnCl_2$, но с повышением концентрации $ZnCl_2$ скорость образования Ar_4A понижается. Подобный эффект обнаружен ранее при исследовании дрожжевой фенилаланил-тРНК-синтетазы [16]. Синтез Ar_3A был более интенсивным и оставался практически на одном уровне в концентрационном интервале 50–150 мкМ $ZnCl_2$. Эти особенности синтеза диаденозинполифосфатов отличаются изучаемый нами фермент от других аминоксил-тРНК-синтетаз. Так, лизил-тРНК-синтетаза из *E. coli* катализировала образование меньшего количества Ar_3A по сравнению с Ar_4A в аналогичных условиях [1], а стимулирующий эффект $ZnCl_2$ на синтез Ar_4A , катализируемый аланил-тРНК-синтетазой из того же источника, наблюдался вплоть до концентрации 400 мкМ [2].

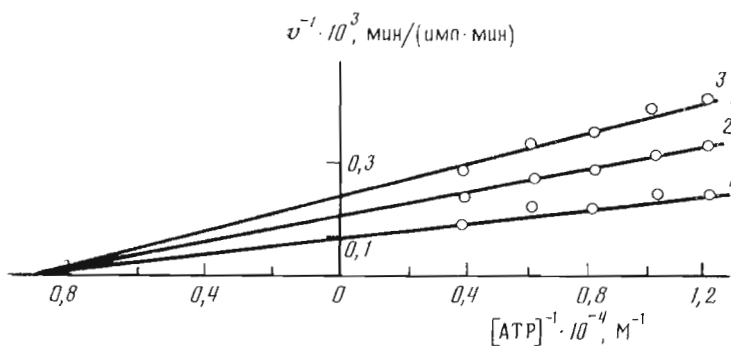


Рис. 1. Зависимость скорости аминоацелирования тРНК^{Phe}, катализируемой фенилаланил-тРНК-синтетазой из *E. coli* MRE-600, от концентрации АТФ при различных концентрациях Ar_4A , в обратных координатах, в отсутствие Ar_4A (1) и в присутствии Ar_4A в концентрации 0,5 мМ (2) и 1 мМ (3)

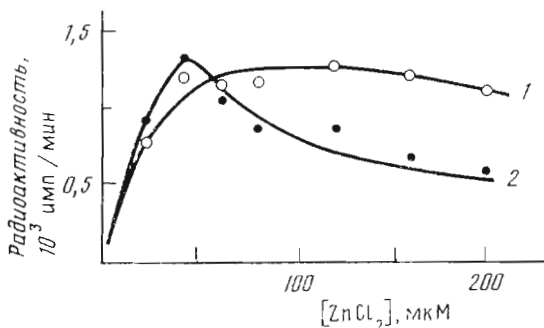


Рис. 2. Зависимость синтеза Ar_3A (1) и Ar_4A (2), катализируемого фенилаланил-тРНК-синтетазой из *E. coli* MRE-600, от концентрации $ZnCl_2$

Значительный синтез Ar_3A , катализируемый фенилаланил-тРНК-синтетазой из *E. coli* MRE-600, позволил предполагать возможное участие этого фермента, как и лизил-тРНК-синтетазы [7], в накоплении диаденозинполифосфатов в клетках *E. coli*, находящихся в состоянии стресса, в частности при тепловом шоке. Эту возможность мы проверили экспериментально, и оказалось, что при 50° С ферментативный синтез Ar_3A и Ar_4A вообще отсутствует, хотя аминоацелирование тРНК^{Phe} оставалось на том же уровне, что и при 37° С.

Исследование влияния фосфонатных аналогов Ar_4A (I) на ферментативный синтез диаденозинполифосфатов показало, что уровень образования Ar_4A не зависит от присутствия в среде аналогов (I) и остается постоянным. В то же время уровень синтеза Ar_3A зависит от добавления аналогов (I) в реакционную среду и их строения. Наибольший эффект ингибирования синтеза Ar_3A достигается в присутствии соединения (Iб) с симметричным расположением CH_2 -группы в олигофосфатной цепи (табл. 2). Введение в CH_2 -группу галоида (Iв) или изменение ее положения (соединения (Iа) и (Iг) соответственно) привело к снижению ингибирующего действия аналога. Интересно, что соединение (Iг) стимулирует как обмен АТФ — [³²P]РР₁, так и процесс образования Ar_3A .

Из полученных данных следует, что Ar_4A и Ar_3A , а также их фосфонатные аналоги слабо взаимодействуют с фенилаланил-тРНК-синтетазой как в реакциях пирофосфатного обмена и аминоацелирования тРНК^{Phe}, так и в процессе биосинтеза диаденозинполифосфатов. Показано низкое сродство Ar_4A и Ar_3A ($K_1=3,7$ мМ для обоих соединений) к триптофан-ил-тРНК-синтетазе из поджелудочной железы быка [17]. Это исключает предположение о регуляторной активности Ar_4A и Ar_3A в отношении фенилаланил-тРНК-синтетазы в системе биосинтеза белка и о роли этого фермента как Ar_4A -связывающего белка.

Экспериментальная часть

В работе использовали АТФ, АДФ, АМФ, *L*-фенилаланил (Reanal, ВНР), *L*-[¹⁴C]фенилаланин (230 Ки/моль), [U-¹⁴C]АТФ (500 Ки/моль, UVVVR, СССР), [³²P]Na₂P₂O₇ (1000 Ки/моль; Изотоп, СССР), ZnCl₂ (Sigma, США), Ар₃А и Ар₄А (P. L. Biochemical, США). Препараты фосфонатных аналогов Ар₄А (соединения (Ia)–(Iг)) получены от Н. В. Тарусовой (ИМБ АН СССР).

Система для ТСХ: диоксан – конц. NH₄OH – вода (6 : 1 : 4). Белок определяли по методике Брэдфорда [18].

Препарат суммарной тРНК из *E. coli* MRE-600 получали согласно работе [19]. Гомогенный, по данным электрофореза в полиакриламидном геле, препарат фенилаланил-тРНК-синтетазы из *E. coli* MRE-600 получен как описано ранее [20].

Активность фенилаланил-тРНК-синтетазы в реакции обмена АТГ – [³²P]РР₁ определяли при 37°С согласно методике [20]. Реакционная смесь объемом 0,2 мл содержала 0,5 мМ *L*-фенилаланин, 50 мМ трис-НСl (рН 8,0), 10 мМ MgCl₂, 1 мМ [³²P]Na₂P₂O₇, 5 или 0,5 мМ АТФ и фермент (5 мкг/мл). При оценке степени ингибирования пирофосфатного обмена аналогами Ар₄А их концентрацию варьировали в диапазоне 0,5–1 мМ. Реакцию аминоацилирования тРНК^{Phe} проводили при 37°С согласно работе [20]. Реакционная смесь объемом 0,2 мл содержала 0,01 мМ *L*-[¹⁴C]фенилаланин, 50 мМ трис-НСl (рН 8,0), 2,5 мМ MgCl₂, 10 мМ KCl, 0,5 мМ АТФ, 2 мкг/мл суммарной тРНК и фермент (0,5 мкг/мл).

При анализе в тех же условиях [20], но в отсутствие АТФ в реакционной смеси, субстратных свойств Ар₃А и Ар₄А в реакциях активации *L*-фенилаланина и аминоацилирования тРНК^{Phe} их концентрацию варьировали в диапазоне 0,5–1 мМ.

Ферментативный синтез Ар₃А и Ар₄А проводили в условиях, аналогичных описанным в работе [15]. Реакционная смесь объемом 0,05 мл содержала 20 мМ трис-НСl (рН 7,8), 7 мМ MgCl₂, 0,15 М KCl, 2 мМ [U-¹⁴C]АТФ, 2 мМ *L*-фенилаланин, 0,2 мМ ZnCl₂, 0,01 мкг/мл дрожжевой пирофосфатазы (Boehringer, ФРГ) и фермент (1 мкг/мл). Инкубацию осуществляли при 37°С в течение 180 мин. Нуклеотиды, образующиеся в процессе реакции, анализировали при помощи ТСХ на пластинках Kieselgel 60F₂₅₄ (Merck, ФРГ) после нанесения в точку 5 мкл инкубационной смеси. Зоны нуклеотидов, идентифицированные по УФ, вырезали и просчитывали радиоактивность на стандартных (1×2 см) мншенях в толуольном сцинтиляторе на спектрометре SL-30 (Intertechnique, Франция). Для экспресс-анализа радиохроматограмм использовали многопроволочную пропорциональную камеру, сопряженную с ЭВМ СМ-4 (СССР) и графопостроителем [21].

Авторы выражают глубокую признательность Н. В. Тарусовой за любезно предоставленные препараты фосфонатных аналогов Ар₄А, В. Н. Анкиловой за предоставление препарата фермента, А. А. Черному за экспресс-анализ радиохроматограмм и Р. М. Хомутову за интерес к работе и ее обсуждение.

ЛИТЕРАТУРА

1. Goerlich O., Foeckler R., Holler E. // Eur. J. Biochem. 1982. V. 126. № 1. P. 135–142.
2. Blanquet S., Plateau P., Brevet A. // Mol. and Cell. Biochem. 1983. V. 52. P. 3–11.
3. Zamecnik P. // Anal. Biochem. 1983. V. 134. № 1. P. 1–10.
4. Rapaport E., Zamecnik P. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1976. V. 73. № 11. P. 3984–3988.
5. Weinmann-Dorsch C., Hedl A., Grummt I., Albert W., Ferdinand E. I., Friis R., Pierrou C., Moll W., Grummt F. // Eur. J. Biochem. 1984. V. 138. № 1. P. 179–185.
6. Zourgui L., Tharaud D., Solari A., Litvak S., Tarrago-Litvak L. // Biochim. et biophys. acta. 1986. V. 866. № 4. P. 222–232.
7. Lee P., Bochner B. R., Ames B. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1983. V. 80. № 4. P. 7496–7500.
8. Denisenko O. N. // FEBS Lett. 1984. V. 178. № 1. P. 149–152.
9. Hilderman R. H. // Biochemistry. 1983. V. 22. № 19. P. 4353–4357.
10. Plateau P., Fromat M., Brevet A., Gesquiere A., Blanquet S. // Biochemistry. 1985. V. 24. № 4. P. 914–922.
11. Grummt F., Weinmann-Dorsch C., Meinecke M. // Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 1984. Bd 365. S. 597–611.
12. Тарусова Н. В., Шумянцева В. В., Крылов А. С., Карнейский М. Я., Хомутов Р. М. // Биоорган. химия. 1983. Т. 9. № 6. С. 838–843.
13. Тарусова Н. В., Загородний С. Г., Осипова Т. И. // Биоорган. химия. 1985. Т. 11. № 6. С. 802–807.
14. Zamecnik P., Stephenson M., Janeway C., Kanderath K. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1966. V. 24. № 1. P. 91–97.
15. Plateau P., Mayaux J.-F., Blanquet S. // Biochemistry. 1981. V. 20. № 16. P. 4654–4662.
16. Rapaport E., Yogeswaran G., Zamecnik P., Remy P. // J. Biol. Chem. 1985. V. 260. № 17. P. 9509–9512.
17. Ковалева Г. К., Меркулова Т. И., Нурбеков М. К. // Молекуляр. биология. 1986. Т. 20. № 2. С. 558–563.
18. Bradford M. // Anal. Biochem. 1976. V. 72. № 1–2. P. 248–254.
19. Саидаджиев Л. С., Старостина В. К., Стефанович Л. Е., Чуцаев В. Н. // Молекуляр. биология. 1967. Т. 1. № 4. С. 463.

20. Анкилова В. Н., Лаврик О. И., Ходырева С. Н. // Прикл. биохимия и микробиол. 1984. Т. 20. № 2. С. 208-216.
21. Заневский Ю. В. и соавт. Препринт ОИЯИ 18-23-5. Дубна, 1983.

Поступила в редакцию
9.XII.1986
После доработки
4.II.1987

THE INFLUENCE OF DIADENOSINE OLIGOPHOSPHATES (Ap_4A AND Ap_3A) AND THEIR ANALOGUES ON THE CATALYTIC FUNCTIONS OF PHENYLALANYL-tRNA SYNTHETASE FROM *E. coli* MRE-600

BIRYUKOV A. I., ZAKHAROVA O. D.*, LAVRIK O. I.*

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

The influence of P^1, P^3 -bis(5'-adenosyl)triphosphate (Ap_3A), P^1, P^4 -bis(5'-adenosyl)tetraphosphate (Ap_4A) and its analogues, containing a residue of methylenediphosphonic acid in various positions of the oligophosphate chain, on the reactions catalysed by phenylalanyl-tRNA synthetase from *E. coli* MRE-600 has been studied. The compounds do not affect significantly the rate of $ATP-[^{32}P]PP_i$ -exchange nor maintain this reaction in the absence of ATP. The diadenosineoligophosphates are shown to be noncompetitive inhibitors of ATP in the tRNA aminoacylation by phenylalanine (for Ap_4A $K_i=1,45 \cdot 10^{-3}$ M). The phosphonate analogues of Ap_4A inhibit the synthesis of Ap_3A depending on their structure. The conclusion is thus drawn that the *E. coli* MRE-600 phenylalanyl-tRNA synthetase does not interact properly with Ap_4A and its phosphonate analogues.