



УДК 577.152.273*2'4042

АФФИННАЯ МОДИФИКАЦИЯ КРЕАТИНКИНАЗЫ ИЗ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ КРОЛИКА С ПОМОЩЬЮ 2', 3'-ДИАЛЬДЕГИДНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ АТР И АДР

Невинский Г. А.

Новосибирский институт органической химии Сибирского отделения Академии наук СССР

Газарянц М. Г., Мкртчян З. С.

Институт экспериментальной биологии Академии наук АрмССР, Ереван

Диальдегидные производные АТР и АДР (оАТР и оАДР соответственно) являются субстратами креатинкиназы из скелетных мышц кролика и модифицируют ϵ -аминогруппу в нуклеотидсвязывающем участке фермента. Полной инактивация киназы соответствует ковалентное присоединение 2 моль оАДР на 1 моль димера. Процесс модификации с помощью оАДР описывается линейной зависимостью логарифма активности фермента от времени, что указывает на псевдопервый порядок реакции. Оценены величины константы скорости модификации киназы ($8 \cdot 10^3 \text{ мин}^{-1}$) и K_d обратимого комплекса фермента с оАДР (62 мкМ). АДР защищает креатинкиназу от инактивации и ковалентного присоединения аналога, а оАДР, связанный ковалентно с ферментом, фосфорилируется с помощью креатинфосфата. Полученные данные позволяют предположить, что ϵ -аминогруппа остатка лизина в активном центре креатинкиназы локализована вблизи рибофуранозного цикла АТР и АДР при образовании последними комплексов с ферментом. По-видимому, эта группа необходима для правильной ориентации полифосфатной цепочки нуклеотидов в активном центре креатинкиназы, но не принимает непосредственного участия в процессах переноса фосфорильного остатка между нуклеотидами и гуанидиневыми субстратами.

Креатинкиназа (АТР: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^{+2} ·АТР на креатин.

До настоящего времени для модификации нуклеотидсвязывающих участков креатинкиназы были использованы аналоги нуклеотидов, содержащие фотоактивную или алкилирующую группировки, присоединенные по концевому фосфату АТР [1—3], этено-АТР [4—6] и этено-АДР [6].

Ранее было показано, что в активном центре фермента (или вблизи него) присутствует остаток лизина, модифицируемый дансилхлоридом и *n*-нитрофенилацетатом [7]. Кроме того, из результатов, полученных методом ЯМР, следует, что в аналоге переходного комплекса (киназа· Mg^{2+} ·АДР-формат-креатин) ϵ - C_H_2 -группа остатка лизина креатинкиназы расположена вблизи протона формиата [8]. На основании этих данных было высказано предположение, что в процессе переноса остатка фосфата непосредственное участие принимает ϵ -аминогруппа остатка лизина [8].

Модификацию ϵ -аминогруппы остатка лизина, расположенного в нуклеотидсвязывающем участке ферментов, часто удается осуществить с помощью диальдегидных производных нуклеотидов, полученных окислением остатка рибозы периодатом натрия [9]. Подобные производные обычно селективно взаимодействуют с остатками лизина и не модифицируют остатки аргинина, гистидина и цистеина [10]. Представлялось интересным исследовать возможность модификации креатинкиназы с помощью оАТР и оАДР (диальдегидные производные) с целью выявления функциональной роли ϵ -аминогруппы в нуклеотидсвязывающем участке фермента.

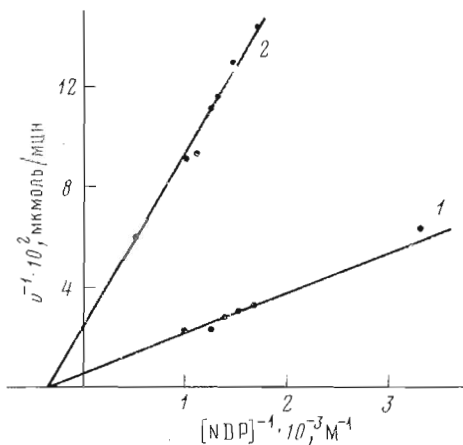


Рис. 1

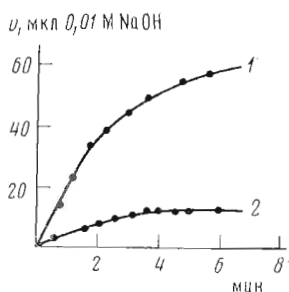


Рис. 2

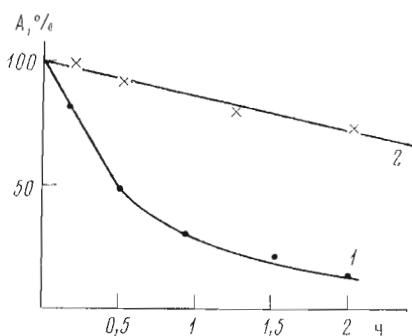


Рис. 3

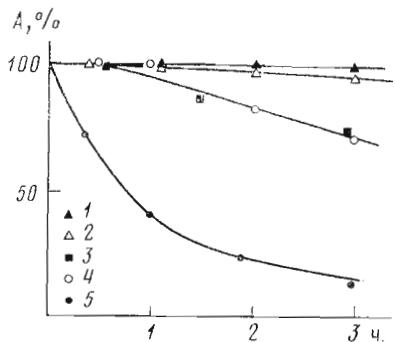


Рис. 4

Рис. 1. Зависимость скорости реакции переноса фосфорильной группы с креатинфосфата на ADP (1) и oADP (2) от концентрации нуклеозиддифосфата

Рис. 2. Кинетические кривые реакции фосфорилирования креатина, катализируемой креатинкиназой при pH 9, при использовании в качестве субстрата 5 mM ATP (1) и 5 mM oATP (2)

Рис. 3. Кинетические кривые инактивации креатинкиназы с помощью 0,2 mM oATP в отсутствие (1) и в присутствии 5 mM ADP (2). Активность фермента определяли с помощью реакции переноса фосфорильного остатка с креатинфосфата на ADP (pH 8)

Рис. 4. Кинетические кривые инактивации креатинкиназы при 30°С в отсутствие лигандов (1), в присутствии 0,17 mM ADP (2), 5 mM ADP (3), 0,17 mM oADP и 5 mM ADP (4) и 0,17 mM oADP (5). Остаточную активность киназы определяли с помощью реакции переноса фосфорильного остатка с креатинфосфата на ADP при pH 7,2, концентрация фермента 0,6 мг/мл

Оказалось, что оба аналога нуклеотидов являются субстратами креатинкиназы. oADP проявляет субстратные свойства в реакции переноса фосфорильного остатка с фосфокреатина на нуклеотид (рис. 1), а oATP — в реакции переноса фосфорильного остатка с нуклеозид-5'-трифосфата на креатин (рис. 2). Как видно из рис. 1, величина K_m для oADP совпадает с величиной K_m для ADP и равна $2,6 \pm 0,3$ mM. Однако величина максимальной скорости для oADP в 4—5 раз меньше, чем для ADP. Аналогично, при насыщающих концентрациях oATP и ATP начальная скорость реакции в случае oATP примерно в 5 раз меньше, чем для ATP (рис. 2).

Эффект несущественного влияния размыкания рибофуранозного цикла на сродство нуклеотидов к ферментам и в то же время выраженного влияния на процесс каталитического превращения ADP и ATP ранее наблюдался и для других ферментов [11, 12]. Такой эффект вполне объясним, если взаимодействие остатка рибозы с соответствующими участками нуклеотидсвязывающего центра ферментов не является определяющим при узнавании нуклеотидов.

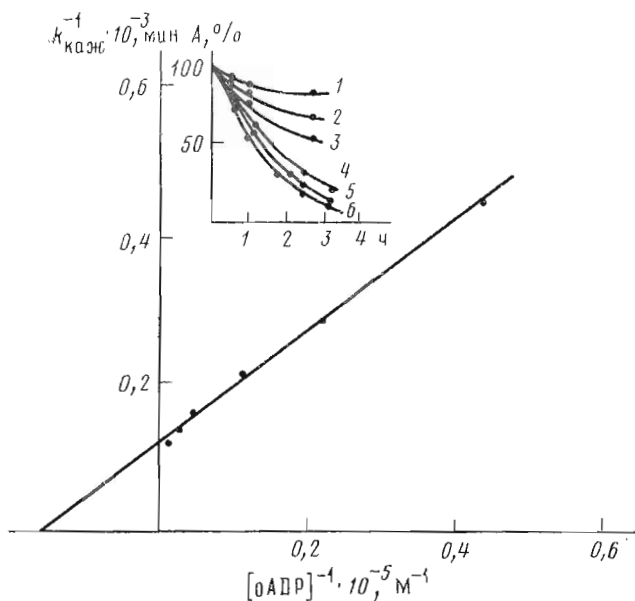


Рис. 5. Зависимость величины $k_{\text{кат}}$ реакции инактивации креатинкиназы от концентрации оАДР. На вставке даны кинетические кривые инактивации фермента при концентрации оАДР: 22,5 (1), 45 (2), 90 мкМ (3), 0,225 (4), 0,45 (5) и 0,9 мМ (6). Кривые 1–6 использованы для оценки величины $k_{\text{кат}}$ при указанных концентрациях оАДР

Предполагая определенную общность рибофуранозилсвязывающих участков ферментов, использующих нуклеотиды, мы попытались блокировать ϵ -аминогруппу лизина в активном центре креатинкиназы с помощью оАТР и оАДР.

Инкубация креатинкиназы с оАТР (рис. 3), так же как и с оАДР (0,17 мМ) (рис. 4), вызывала инактивацию фермента. Добавление АДФ (5 мМ) в реакционные смеси приводило к защите киназы от инактивации, однако защита была неполной. Для выяснения причин отсутствия полной защиты было исследовано влияние АДФ на активность фермента. Как видно из рис. 4, инкубация киназы с АДФ (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 инкубационную смесь одновременно АДФ (5 мМ) и оАДР (0,17 мМ). Это указывает на то, что отсутствие полной защиты креатинкиназы с помощью АДФ скорее всего является следствием ее частичной инактивации в присутствии высоких концентраций нуклеотидов. В литературе имеются данные об увеличении лабильности олигомерных нуклеотидзависимых ферментов при добавлении нуклеотидов в высокой концентрации [13, 14]. В случае креатинкиназы, как и для других ферментов, частичная инактивация в присутствии нуклеотидов в высокой концентрации может быть связана с диссоциацией более стабильного к физико-химическим воздействиям димера до отдельных лабильных субъединиц [13].

Полной инактивации фермента соответствовало ковалентное присоединение 2 моль аналога на 1 моль димера. Добавление АДФ (5–10 мМ) приводило к полной защите креатинкиназы от ковалентного присоединения [^{14}C]оАДР.

Аффинный характер модификации киназы с помощью оАТР и оАДР указывал на блокирование ϵ -аминогруппы остатка лизина вблизи рибофуранозилсвязывающего участка активного центра фермента. Дополнительное доказательство образования основания Шиффа между оАДР и остатком лизина креатинкиназы было получено при сравнении включения ^3H -метки в нативный белок и белок, модифицированный с помощью оАДР, после их обработки [^3H] боргидридом натрия. Креатинкиназа, инактиви-

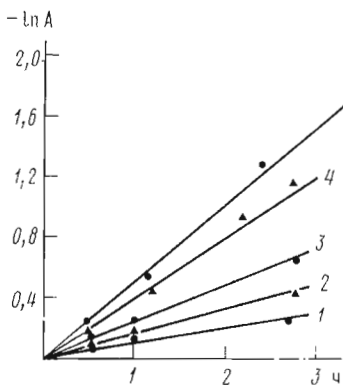


Рис. 6. Зависимость логарифма активности креатинкиназы от времени при инкубации фермента с oADP в концентрации 22,5 (1), 45 (2), 90 мкМ (3), 0,225 (4) и 0,45 мМ (5). Активность фермента определяли с помощью реакции переноса фосфорильного остатка с креатинфосфата на ADP при pH 7,2. Активность фермента (A) в начальный момент инкубации принимали за единицу

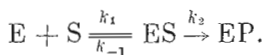
рованная с помощью oADP на 80—90%, содержала, согласно включению ^3H -метки, 0,65—0,8 двойных связей N=C на субъединицу фермента, или 1,3—1,6 связей N=C на димер.

На рис. 5 приведены данные по аффинной модификации киназы при различных концентрациях oADP. Видно, что степень инактивации возрастает при увеличении времени инкубации фермента с аналогом. Линейная зависимость логарифма активности киназы от времени инкубации с oADP (рис. 6) свидетельствует о псевдопервом порядке реакции модификации креатинкиназы с помощью диальдегидного производного ADP.

На основании данных, приведенных на рис. 5, были найдены величины k модификации креатинкиназы с помощью oADP ($8 \pm 0,4 \cdot 10^{-3} \text{ мин}^{-1}$) и K_d обратимого комплекса фермента с oADP ($62 \pm 2 \text{ мкМ}$). Величина константы скорости модификации креатинкиназы oADP хорошо согласуется с аналогичными величинами, полученными для oATP в случае ряда других нуклеотидзависимых ферментов [11].

Особый интерес представляет тот факт, что величина K_d комплекса киназы с oADP, определенная в данной работе с помощью метода Китса — Вилсона [15], практически совпадает с величиной K_d (64 мкМ), полученной в работе [5] для комплекса фермента с ADP с помощью метода флуориметрического титрования в присутствии зонда.

Величины K_m для ADP и oADP примерно в 50 раз превышают величины K_d комплексов этих субстратов с креатинкиназой. Очевидно, что как в случае ADP, так и в случае oADP при взаимодействии этих нуклеотидов с креатинкиназой не выполняется механизм Михаэлиса — Ментена, предполагающий, что фермент-субстратный комплекс находится в термодинамическом равновесии со свободным ферментом и субстратом, выполняемом при соотношении $k_2 \ll k_{-1}$:



В рассматриваемых случаях величины k_2 для oADP и ADP сравнимы или больше величины k_{-1} , что соответствует механизму Бриггса — Холдейна [16].

Равенство величины K_m для ADP и oADP и особенно величин K_d комплексов креатинкиназы с ADP и oADP указывает на несущественную роль рибофуранозного цикла на стадии связывания нуклеотидов с креатинкиназой. Уменьшение в 4—5 раз максимальной скорости превращения ADP и ATP после размыкания их рибофуранозных циклов окислением периодатом натрия, по-видимому, может быть связано с изменением ориентации полифосфатной группировки нуклеотидов относительно важных для катализа группировок активного центра фермента. Данные по исследованию креатинкиназы с помощью метода ЯМР [8], приведенные выше, говорят о том, что ϵ -аминогруппа остатка лизина в комплексе креатинкиназы с нуклеотидами находится в контакте с полифосфатной цепочкой, а не с остатком рибозы этих субстратов. Поскольку после окисления рибозы должна существенно увеличиваться подвижность 2'- и 3'-атомов углерода нуклеотидов, блокирование ϵ -аминогруппы остатка лизина, расположен-

ного вблизи участка связывания полифосфатной группировки, не кажется невозможным. Не исключено, что эта аминогруппа выполняет какую-либо общую функцию, которая не связана непосредственно с процессами каталитического превращения субстратов.

Таким образом, результаты по исследованию связывания АТФ с нуклеотидзависимыми ферментами с помощью методов быстрой кинетики согласуются с предположением о том, что такое связывание протекает в две стадии: 1) ассоциация и 2) более медленная изомеризация образовавшегося комплекса [16, 17]. Как следует из работы [6], в случае креатинкиназы из скелетных мышц кролика скорость изомеризации комплексов фермента с АТФ и АДФ существенно увеличивается в присутствии соответствующих гуанидиниевых субстратов. Не исключено, что ϵ -аминогруппа остатка лизина в активных центрах ферментов может быть необходимой для дополнительной координации полифосфатной группировки относительно функциональных групп активных центров на стадии, соответствующей медленному процессу изомеризации первоначально образованного комплекса нуклеотида с белком. В этом случае можно ожидать неполного «выключения» процесса катализа превращения оАДФ после его ковалентного присоединения по ϵ -аминогруппе остатка лизина активного центра креатинкиназы.

Для проверки этой гипотезы после модификации киназы с помощью оАДФ избыток реакционноспособного нуклеотида был удален из раствора фермента с помощью метода гель-фильтрации. Затем модифицированный фермент был инкубирован с креатинфосфатом. Низкомолекулярные лиганды были удалены повторной гель-фильтрацией модифицированного белка. Ковалентная связь между креатинкиназой и диальдегидным производным нуклеотида была разрушена инкубацией препаратов модифицированного белка при pH 6 в течение 5—6 ч (35°C). Данные последующего анализа нуклеотидного материала гидролизатов модифицированной креатинкиназы до инкубации и после инкубации с креатинфосфатом (рис. 7) свидетельствуют о том, что инкубация киназы, содержащей ковалентно связанный оАДФ, приводит к фосфорилированию аффинной метки и образованию ковалентно связанного с ферментом оАТФ. Таким образом, блокирование ϵ -NH₂-группы остатка лизина не исключает возможности протекания реакции, катализируемой ферментом. Это может свидетельствовать о том, что аминогруппа в активном центре креатинкиназы не участвует непосредственно в процессе переноса фосфорильного остатка между нуклеотидными и гуанидиниевыми субстратами. Скорее всего, как уже обсуждалось выше, она выполняет вспомогательную функцию в процессе катализа.

В литературе имеются данные об исчезновении субстратных свойств адениновых нуклеотидов после окисления рибозы с помощью периодата натрия при сохранении сродства к ферментам, сравнимого со сродством природных субстратов в случае некоторых нуклеотидзависимых ферментов. Например, оАТФ является эффективным ингибитором и аффинным реагентом ряда аминоацил-тРНК-синтетаз [10]. Не исключено, что в случае некоторых ферментов роль ϵ -NH₂-группы остатка лизина вблизи рибофуранозилсвязывающих участков активных центров белков несколько иная. Так, ферменты могут проявлять повышенные по сравнению с креатинкиназой требования к стадии подстройки трифосфатной цепочки при образовании комплексов переходного состояния. Более того, роль ϵ -аминогруппы остатка лизина, по-видимому, в ряде случаев могут выполнять другие группировки. В работах [11, 18] показано, что фенилаланил-тРНК-синтетаза из различных источников не содержит остатка лизина в активных центрах. В то же время для фенилаланил-тРНК-синтетазы из *E. coli* MRE-600 показано присутствие в активном центре фермента гуанидиниевой группировки остатка аргинина [11].

Таким образом, с помощью 2',3'-диальдегидных производных АТФ и АДФ достигнуто блокирование ϵ -аминогруппы остатка лизина креатинкиназы вблизи участка связывания рибофуранозного цикла. Показано, что блокирование аминогруппы остатка лизина не приводит к прекращению

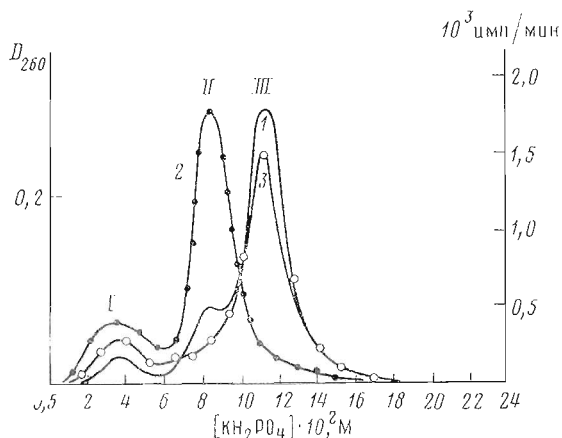


Рис. 7. Результаты микроколоночной хроматографии 0,2 OE_{260} стандартной смеси α AMP, α ADP и α ATP после добавления ^{14}C -метченого нуклеотидного материала (приблизительно 0,02 OE_{260}), полученного гидролизом ковалентной связи между аффинной меткой и ферментом. Пик I соответствует α AMP; II — α ADP; III — α ATP, согласно поглощению люота при 260 нм (I); кривая 2 отражает содержание ^{14}C -метки в пиках нуклеотидного материала в случае киназы, модифицированной с помощью [^{14}C] α ADP до инкубации с креатинфосфатом; кривая 3 — после инкубации с креатинфосфатом. Условия см. «Экспериментальную часть»

процесса переноса фосфорильной группы с фосфокреатина на ковалентно связанный с ферментом α ADP. Скорее всего, основная функция NH_2 -группы остатка лизина в активном центре креатинкиназы заключается не в связывании субстрата и не в участии в процессе обратимого фосфорилирования, а в ориентации полифосфатной группировки нуклеотидов до оптимально необходимой для катализа конформации.

Экспериментальная часть

В работе использовали креатинфосфат, ATP и ADP (Reanal, ВНР), креатин (Chemarol, ЧССР), 2-N-гидроксиэтилпиперазин-N'-2-этансульфокислоту (HEPES) фирмы Merck (ФРГ), имидазол (Reanal), трижды перекристаллизованный из бензола, [3H]боргидрид натрия с уд. акт. 2,9 Ки/ммоль и [^{14}C]ADP с уд. акт. 0,46 Ки/ммоль отечественного производства. Остальные реагенты были квалификации ос.ч. и х.ч.

Креатинкиназа из скелетных мышц кролика была выделена по методу Кьюби [19] в модификации Четвериковой [20]. Фермент был 85—90% чистоты. Гомогенный препарат киназы был получен дополнительной очисткой на сефарозе с иммобилизованным голубым декстраном согласно методу [3].

Активность фермента в прямой реакции определяли потенциометрически при 30°С с непрерывным перемешиванием. Реакционная смесь объемом 1,5 мл содержала 40 мМ креатин, 5 мМ ацетат магния, 1 мМ дитиотреит, 0,1 мМ ЕДГА, 0,1 М ацетат натрия и 0,2—10 мМ ATP или α ATP. О величине начальной скорости судили по расходу 0,01 М NaOH за первые 1—2 мин, поддерживая в реакционной среде pH 9.

Активность фермента в реакции переноса фосфорильного остатка с креатинфосфата на ADP (обратная реакция) определяли колориметрическим методом [21]. Реакционная смесь объемом 0,15 мл содержала 5—15 мМ креатинфосфат; 0,1 М трис-ацетатный буфер, pH 7,2 (или 0,1 М HEPES — NaOH-буфер, pH 8); 5 мМ ADP. При исследовании субстратных свойств нуклеотидов концентрации ADP и α ADP варьировали в диапазоне 0,2—5 мМ. Ацетат магния добавляли в реакционную смесь в трехкратном избытке по отношению к нуклеотиду. После 1—2 мин инкубации смеси при 30°С реакцию останавливали добавлением 0,2 мл щелочной смеси, содержащей 1% α -нафтола, затем 0,1 мл 0,25% раствора диацетила.

Полученный раствор разбавляли 2—4 мл воды и определяли количество образовавшегося креатина колориметрически при 520 нм.

Модификацию креатинкиназы с помощью оАДР и оАТР проводили при 30° С. Инкубационная смесь объемом 0,2—1 мл содержала 0,5—0,6 мг/мл креатинкиназы; 0,5 М имидазол-ацетатный буфер, рН 7,6; 0,01—1 мМ оАДР (или оАТР). При исследовании защитного действия субстрата АДР добавляли в концентрации 1—10 мМ. Во всех случаях инкубационные смеси содержали ацетат магния в концентрации, в 3 раза превышающей суммарную концентрацию нуклеотидов. Пробы объемом 10—30 мкл отбирали через разные промежутки времени и использовали для определения степени модификации фермента и его каталитической активности. Определение активности проводили как описано выше. Для определения степени модификации модифицированный белок подвергали гель-фильтрации на колонке с сефадексом G-100 для отделения от низкомолекулярных лигандов. Количество аналога, присоединенного ковалентно к ферменту, определяли по разнице радиоактивности в пиках белка, подвергнутого гель-фильтрации сразу после добавления аналога к ферменту, и белка после инкубации фермента с аналогом. Определение стехиометрии ковалентного присоединения после восстановления основания Шиффа и без обработки белка боргидридом натрия приводило к одинаковым результатам (в последнем случае гель-фильтрацию пробы фермента проводили в течение 5—15 мин после ее отбора из реакционной смеси).

Восстановление основания Шиффа, образованного оАДР с креатинкиназой, проводили согласно работе [22]. К 50 мкл растворов нативного фермента (0,5 мг/мл) и фермента (0,5 мг/мл), модифицированного с помощью оАДР (избыток оАДР предварительно удаляли гель-фильтрацией), в 5 мМ боратном буфере, рН 9,2, добавляли 1 мкл (1 мкмоль) раствора [³H]боргидрида натрия в 0,1 М NaOH. Растворы инкубировали 40 мин при 10° С, а затем подвергали гель-фильтрации на колонке с сефадексом G-100 (объемом 3 мл). Фракции, соответствующие пикам белка, собирали и определяли содержание ³H-метки.

Фосфорилирование оАДР, ковалентно связанного креатинкиназой, осуществляли следующим образом. Фермент (0,4 мл, 0,6 мг/мл) инкубировали с [¹⁴C]оАДР (0,3 мМ) в течение 1,5—2 ч при 30° С, как описано выше. Затем раствор фермента подвергали гель-фильтрации на колонке с сефадексом G-100 (объемом 10 мл), уравновешенной водой. Первую половину белкового пика (1,5 мл) затем инкубировали в течение 15 мин при 30° С в смеси объемом 2 мл, содержащей 7 мМ креатин, 1 мМ ацетат магния и 0,1 М ПEPES — NaOH-буфер, рН 8. После лиофилизации раствора до 0,5 мл фермент подвергали повторной гель-фильтрации на указанной выше колонке. Вторую половину белкового пика после первой гель-фильтрации и пик белкового материала после второй гель-фильтрации выдерживали 6 ч при 35° С (рН 6). При этом наблюдалось расщепление ковалентной связи (основания Шиффа) между белком и аффинной меткой. Нуклеотидный материал гидролизатов модифицированных препаратов креатинкиназы анализировали на содержание ¹⁴C-меченых оАМР, оАДР и оАТР в системе Томлинсона — Тенера на колонке с микрогранулированной DE-41-целлюлозой. Хроматографии подвергали 0,20E₂₆₀ стандартной смеси немеченых оАМР, оАДР, оАТР, в которую добавляли приблизительно 0,020E₂₆₀ ¹⁴C-меченого нуклеотидного материала гидролизатов. За выходом пиков нуклеотидного материала следили по поглощению элюата при 260 нм с помощью микроспектрофотометра «Обь» отечественного производства. Элюат собирали по каплям на нитроцеллюлозные диски, сушили и просчитывали на содержание ¹⁴C-метки в толуольном сцинтилляторе с помощью счетчика радиоактивности Mark-II (Nuclear Chicago, США). О содержании оАДР и оАТР, ковалентно связанных с креатинкиназой, судили по количеству метки в пиках нуклеотидов, соответствующих (по месту выхода при элюции) оАДР и оАТР.

Синтез оАДР и оАТР проводили окислением АДР и АТР соответственно с помощью периодата натрия по аналогии с работой [9] с существенными модификациями. К раствору (15 мл) 1 ммоль нуклеотида (АДР или АТР),

pH 7,5, добавляли раствор (15 мл) 1,5 ммоль NaIO₄, pH 7,5 (pH доводили 1 M NaOH). Растворы компонентов реакционной смеси предварительно охлаждали до 4° С. Реакционную смесь оставляли в темноте на 1 ч при 4° С. Затем раствор последовательно замораживали при -20° С и аккуратно размораживали при 5° С. Выпавший при замораживании реакционной смеси осадок продуктов восстановления периодата натрия отфильтровывали от раствора на миллиметровом фильтре HUFFS. Для удаления непрореагировавшего периодата натрия и следов продуктов его восстановления нуклеотидный материал подвергали осаждению с помощью 120 мл ацетона, содержащего 1% перхлората натрия (пересаживание нуклеотида после растворения осадка в 5 мл воды проводили еще 3 раза). Выпавший осадок центрифугировали при 10° С в течение 10 мин при 6000 об/мин, промывали дважды 70 мл холодного ацетона и высушивали в вакууме. Выходы оADP и оАТР составили 60—70%.

Анализ продуктов окисления ADP и АТР с помощью ТСХ на PEI-целлюлозных пластинках в 0,8 M ацетате аммония показал, что реакция окисления нуклеотидов в использованных нами условиях протекала количественно. Препараты оADP и оАТР не содержали примесей иодсодержащих солей. Согласно данным хроматографии в системе Томлинсона — Тенера, препараты оADP и оАТР содержали не более 0,5% примесей нуклеотидной природы (оAMP и оADP).

Авторы глубоко признательны О. И. Лаврик за активное участие в развитии работы и ценные замечания при написании данной статьи, Д. Г. Кнорре и Ж. И. Акоюн за постоянный интерес и внимание к работе.

ЛИТЕРАТУРА

- Газарянц М. Г., Мкртчян З. С., Нерсесова Л. С., Курбатов В. А., Кнорре Д. Г., Акоюн Ж. И. Докл. АН АрмССР, 1978, т. 66, № 3, с. 160—163.
- Акоюн Ж. И., Газарянц М. Г., Мкртчян З. С., Нерсесова Л. С., Лаврик О. И., Попов Р. А. Биохимия, 1981, т. 46, № 2, с. 262—268.
- Невинский Г. А., Анкилова В. Н., Лаврик О. И., Мкртчян З. С., Нерсесова Л. С., Акоюн Ж. И. Биохимия, 1983, т. 48, № 2, с. 339—349.
- Невинский Г. А., Денисов А. Ю. Биоорган. химия, 1981, т. 7, № 11, с. 1693—1700.
- Денисов А. Ю., Невинский Г. А., Лаврик О. И. Биохимия, 1982, т. 47, № 2, с. 184—190.
- Денисов А. Ю., Невинский Г. А., Лаврик О. И. Биоорган. химия, 1982, т. 8, № 1, с. 72—79.
- Watts D. C. In: The Enzymes/Ed. Boyer P. D., 1973, v. 8, p. 383—455.
- James T. L., Cohn M. J. Biol. Chem., 1974, v. 249, № 8, p. 2599—2604.
- Easterbrook-Smith S. B., Wallece J. C., Keech D. B. Eur. J. Biochem., 1976, v. 62, № 1, с. 125—130.
- Dalocchio F., Negrini R., Signorini M., Ripa M. Biochim. et biophys. acta, 1976, v. 429, № 3, p. 629—634.
- Fayal G., Fromant M., Blanquet S. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1978, v. 75, № 5, p. 2088—2092.
- Горшкова П. И., Дацый И. П., Лаврик О. И., Невинский Г. А. Биохимия, 1981, т. 46, № 4, с. 699—707.
- Наградова Н. К. Биохимия, 1977, т. 42, № 3, с. 379—395.
- Невинский Г. А. Аффинная модификация аминокислот-гРНК-синтетаз химически активными аналогами нуклеотидов. Автореф. дис. канд. хим. наук. М.: МГУ, 1979, с. 85—89.
- Kitz R., Wilson J. V. J. Biol. Chem., 1962, v. 273, № 10, p. 3245—3249.
- Фершт Э. В кн.: Структура и механизм действия ферментов. М.: Мир, 1980, с. 112—115.
- Holler E., Calvin M. Biochemistry, 1972, v. 11, № 20, p. 3741—3752.
- Mehler A. H., Kim J.-J. P., Olsen A. A. Arch. Biochem. and Biophys., 1981, v. 212, № 2, p. 475—482.
- Kuby S. A., Noda L., Lardy H. A. J. Biol. Chem., 1954, v. 209, № 1, p. 203—210.
- Четверикова Е. П., Крипская А. В., Розанова Н. А., Рыбина В. В., Алиевская Л. Л. Биохимия, 1970, т. 35, № 5, с. 953—961.
- Ennor A. H., Rosenberg H. Biochem. J., 1952, v. 51, № 4, p. 606—610.
- Moore G., Crichton R. R. FEBS Lett., 1973, v. 37, № 1, p. 74—78.

Поступила в редакцию
28.VII.1982

AFFINITY MODIFICATION OF CREATINE KINASE FROM RABBIT SKELETAL
MUSCLE BY 2', 3'-DIALDEHYDE DERIVATIVES OF ADP AND ATP

NEVINSKY G. A., GAZARYANTS M. G., MKRTCHYAN Z. S.

*Novosibirsk Institute of Organic Chemistry, Siberian Branch
of the Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk; Institute
of Experimental Biology, Academy of Sciences of the
Armenian SSR, Yerevan*

Periodate-oxidized ADP and ATP (oADP and oATP) are substrates and affinity reagents for creatine kinase from rabbit skeletal muscle. oADP and oATP modified a lysine ϵ -amino group in the nucleotide-binding site of the enzyme. Complete inactivation is observed upon binding 2 moles oADP per 1 mole of the enzyme dimer. Modification with oADP is described by a linear dependence of the log of enzyme activity on time, testifying to a pseudo-first-order of the reaction. The reaction rate constant ($k_i=8 \cdot 10^3 \text{ min}^{-1}$) and dissociation constant for the reversible enzyme-oADP complex ($K_d=62 \text{ }\mu\text{M}$) were determined. ADP protected the enzyme from inactivation and covalent binding of the analog, whereas oADP covalently bound to the enzyme was phosphorylated by phosphocreatine. The data obtained allow to suggest that the ϵ -amino group of a lysine residue of the active site is located in close proximity to ribose of ATP and ADP forming a complex with the enzyme. This group seems essential for correct orientation of the nucleotide polyphosphate chain in the enzyme active center, but take no immediate part in the transphosphorylation process.