

УДК 577.150.4

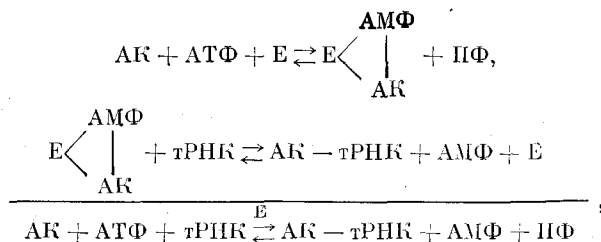
БИОХИМИЯ

В. С. ПРАСОЛОВ, А. М. КРИЦЫН, С. Н. МИХАЙЛОВ, В. Л. ФЛОРЕНТЬЕВ

**ВЛИЯНИЕ 9-(ω' -ОКСИАЛКИЛ)-АДЕНИНОВ И ИХ ТРИФОСФАТОВ
НА РЕАКЦИЮ АТФ-[32 P]-ПИРОФОСФАТНОГО ОБМЕНА,
КАТАЛИЗИРУЕМУЮ ТРИПТОФАНИЛ-ТРНК-СИНТЕТАЗОЙ**

(Представлено академиком А. А. Баевым 16 I 1975)

Аминоацил-ТРНК-синтетазы — ключевые ферменты белкового синтеза, катализирующие специфическое присоединение аминокислот к соответствующим тРНК. Общая последовательность превращений, катализируемых синтетазой, может быть изображена следующими уравнениями:



где АК — аминокислота, Е — аминоацил-ТРНК-синтаза, ПФ — пирогосфат.

Очевидно, что единственным идентичным для всех аминоацил-ТРНК-синтетаз субстратом является АТФ, тогда как каждая пара АК и тРНК служит субстратом лишь для одной аминоацил-ТРНК-синтетазы. К настоящему времени проведено большое число исследований, касающихся узнавания и связывания «своих» тРНК и аминокислот аминокислот-ТРНК-синтетазами (¹), в то время как взаимодействию АТФ с синтетазами посвящено всего лишь небольшое число работ (²⁻⁴).

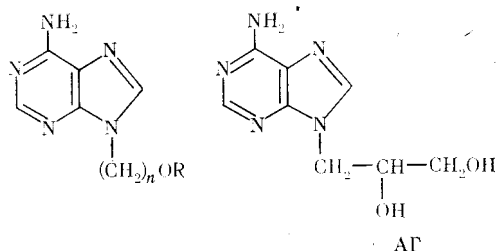
Вместе с тем известно, что значения K_m для АТФ у аминоацил-ТРНК-синтетаз весьма различны. Еще большие различия наблюдаются в значениях K_i аденозина и его производных, которые у различных синтетаз могут быть равными, превышать на порядок или быть на порядок ниже значений K_m АТФ, хотя во всех случаях ингибирование аденозином носит конкурентный по отношению к АТФ характер в реакции АТФ-[32 P]-пирогосфатного обмена. Указанные различия свидетельствуют о том что, несмотря на идентичную функцию АТФ, связывающие участки активных центров различных аминокислот-ТРНК-синтетаз заметно различаются.

Использование аналогов АТФ и аденозина позволит, вероятно, получить информацию о функциональных группах, принимающих участие в связывании субстрата и поддержании каталитической активности фермента. Наряду с этим исследования в данной области весьма существенны для синтеза и применения аффинных меток — соединений, ковалентно присоединяющихся к группам активного центра и позволяющих с помощью различных методов выделить пептиды, формирующие активный центр.

В настоящей работе исследовали влияние аденозина, аденина, 9-(ω' -оксикалкил)-аденинов, их трифосфатов и 3'-О-метил-АТФ на реакцию АТФ-[32 P]-пирогосфатного обмена, катализируемую высокоочищенной триптофанил-ТРНК-синтетазой (ТРСазой) (ЕС 6.1.1.) из поджелудочной железы быка, выделенной по методике (⁵). Степень АТФ-[32 P]-пирогос-

сфатного обмена измеряли, как описано в (6). Инкубационная смесь (0,2 мл) содержала: 0,01 *M* $MgCl_2$; 0,05 *M* трис- HCl pH 7,5; $2 \cdot 10^{-6}$ *M* L-триптофан; $3-6 \cdot 10^{-3}$ *M* [^{32}P] пирогосфат, желатину (0,1 мг/мл); ТРСазу ($6-6,5 \cdot 10^{-3}$ мг/мл). При определении влияния аденозина, трифосфатов 9-(ω' -оксиалкил)-аденинов и 3'-О-метил-АТФ использовали 3 концентрации АСФ: $2,5 \cdot 10^{-4}$ *M*; $5 \cdot 10^{-4}$ *M* и $1 \cdot 10^{-3}$ *M*. Во всех остальных случаях концентрация АТФ была: $0,625 \cdot 10^{-4}$ *M*; $1,25 \cdot 10^{-4}$ *M* и $2,5 \cdot 10^{-4}$ *M*. Соединения, способные давать комплекс с Mg^{2+} , вносились с эквимолярным количеством $MgCl_2$. Значения K_i определяли, как описано в (7).

Синтез 9-(2'-оксиэтил)-аденина (АЭ), 9-(3'-оксипропил)-аденина (АП), 9-(4'-оксибутил)-аденина (АБ), 9-(2',3'-диоксипропил)-аденина (АГ) из трифосфатов (АЭтФ, АПтФ и АБтФ) и 3'-О-метил-АТФ описан в (8-10). Структурные формулы следующие:



АЭ: $n=2$; $R=H$. АЭтФ: $n=2$; $R=P_3O_7H_4$.

АП: $n=3$; $R=H$. АПтФ: $n=3$; $R=P_3O_7H_4$.

АБ: $n=4$; $R=H$. АБтФ: $n=4$; $R=P_3O_7H_4$.

Аденозин, аденин, 9-(ω' -оксиалкил)-аденины и их трифосфаты являются по отношению к АТФ конкурентными ингибиторами в реакции

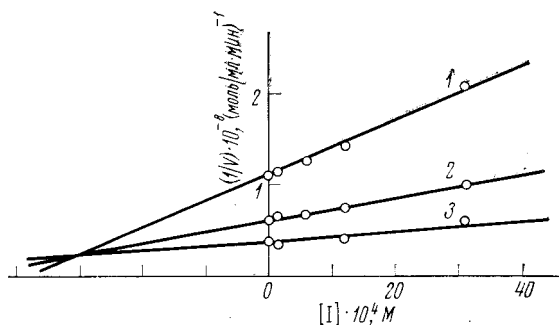


Рис. 1. Влияние аденозина на реакцию АТФ- $[^{32}P]$ -пирогосфатного обмена, катализируемого ТРСазой. Концентрация АТФ: 1 - $2,5 \cdot 10^{-4}$ *M*, 2 - $5 \cdot 10^{-4}$ *M*, 3 - 10^{-3} *M*

АТФ- $[^{32}P]$ -пирогосфатного обмена (рис. 1). В табл. 1 приведены значения K_i для этих соединений.

Аденозин и АТФ обладают близким сродством, тогда как сродство аденина АЭ, АП и АБ почти на порядок ниже. Введение второго гидроксила в алкильную цепь (АГ) снижает K_i до величины, близкой к K_i аденозина. Интересно отметить, что и рацемический АГ и один из энантимеров — (S)-АГ, имеющий сходную с аденозином конфигурацию при $C2'$ -атоме, обладают одинаковым сродством. Таким образом, конфигурация при $C2'$ -атоме, по крайней мере в случае ациклической системы, несущественна для связывания ингибитора с активным центром фермента.

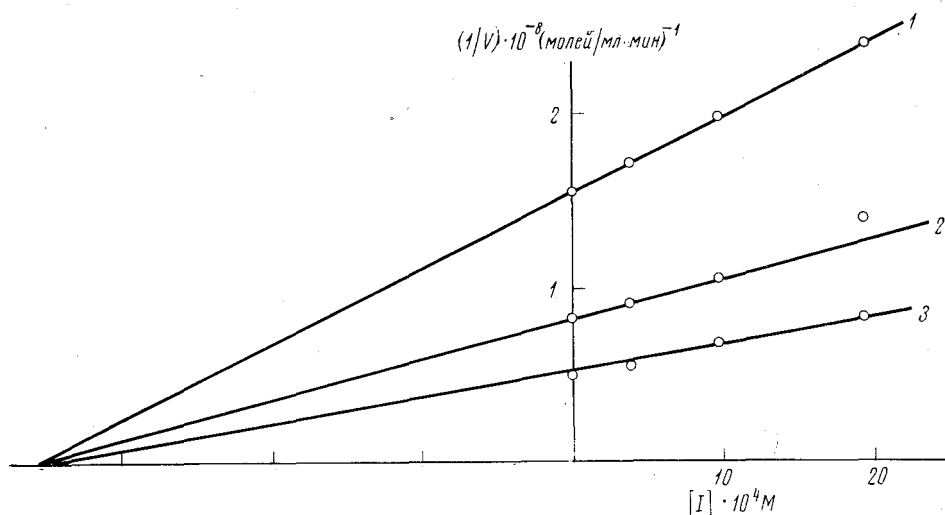


Рис. 2. Влияние 3'-О-метил-АТФ на реакцию АТФ-[^{32}P]-пирофосфатного обмена, катализируемую ТРСазой. 1–3 – то же, что в подписи к рис. 1

Значения K_i трифосфатов 9-(ω' -оксиалкил)-производных аденина выше значений K_i нефосфорилированных соединений и приближаются к величине K_M АТФ.

Ингибирование 3'-О-метил-АТФ носит неконкурентный характер (рис. 2). Полученные результаты свидетельствуют о том, что существенный вклад в связывание АТФ АТФ-связующим участком активного центра триптофанил-тРНК-синтетазы вносит нуклеозидная компонента АТФ. Наличие рибофуранозного цикла не обязательно: K_i АГ и аденозина весьма схожи и составляют 5 мМ и 3,1 мМ соответственно. Наличие гликольной группировки в алкильном радикале существенно для взаимодействия лиганда и связывающего участка: сродство АГ в 4 раза выше сродства АП.

Характер ингибирования 3'-О-метил-АТФ указывает, что молекула ТРСазы, наряду с АТФ-связывающим участком активного центра, возможно, содержит и дополнительные последовательности, взаимодействующие с аденозиновыми нуклеотидами.

Этот факт наравне с более высоким сродством АПТФ указывает, вероятно, на особую роль 3'-гидроксильной группы в связывании АТФ с активным центром, а возможно, и ферментативной реакции.

Авторы приносят благодарность Л. Л. Киселеву и О. О. Фаворовой за постоянный интерес к работе и ценные советы.

Институт молекулярной биологии Академии наук СССР

Москва

Поступило
27 XII 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ L. L. Kisselev, O. O. Favorova, *Advances in Enzymology*, v. 40, N. Y., 1974. ² D. Santi, P. Daneberg, K. Montgomery, *Biochemistry*, v. 10, 25, 4821 (1971). ³ F. Lawrence, *Europ. J. Biochem.*, v. 40, 2, 493 (1973). ⁴ F. Lawrence, D. J. Shire, J. P. Wailer, v. 41, 1, 73 (1974). ⁵ O. O. Фаворова, Л. Л. Кочкина и др., *Мол. биол.*, т. 8, 5, 729 (1974). ⁶ G. A. Nevinsky, O. O. Favorova et al., *FEBS Letters*, v. 43, 2, 135 (1974). ⁷ M. Dixon, *Biochem. J.*, v. 55, 1, 170 (1953). ⁸ А. М. Крицын, С. Н. Михайлов и др., *Изв. АН СССР, сер. хим.*, № 11, 2582 (1974). ⁹ С. Н. Михайлов, Л. И. Колобушкина и др., *Изв. АН СССР, сер. хим.*, № 11, 2588 (1974). ¹⁰ А. М. Крицын, Л. И. Колобушкина и др., *Хим. гетероциклич. соед.*, № 1, 125 (1975).