



Структура и функция биополимеров

УДК 577.152.611

ИССЛЕДОВАНИЕ АТР- И ПИРОФОСФАТСВЯЗЫВАЮЩИХ УЧАСТКОВ ТРИПТОФАНИЛ-тРНК-СИНТЕАЗЫ С ПОМОЩЬЮ ФОСФОНАТНЫХ АНАЛОГОВ АТР И ПИРОФОСФАТА

Т. И. Меркулова, М. К. Нурбеков, Г. К. Ковалева

Введение. Аминоацил-тРНК-синтетазы (КФ 6.1.1.) катализируют с высокой точностью вне-рибосомную стадию белкового синтеза — активацию аминокислоты с промежуточным образованием прочно связанного с ферментом аминоациладенилата и последующим переносом активированного аминоацильного остатка на специфическую тРНК [1].

Помимо этого многие аминоацил-тРНК-синтетазы катализируют синтез необычного динуклеотидного производного P^1, P^4 -бис (5'-аденозил)тетрафосфата (Ar_4A), играющего важную регуляторную роль в метаболизме клетки [2—4]. Эта реакция также проходит стадию образования триптофаниладенилата с последующим переносом активированного остатка АМР на молекулу АТР. Хотя АТР — универсальный источник энергии в реакции активации аминокислоты, аминоацил-тРНК-синтетазы различной аминокислотной и даже видовой специфичности по-разному взаимодействуют с аналогами АТР [1]. Поэтому изучение участков связывания АТР способствует пониманию как общего механизма действия, так и особенностей функционирования отдельных ферментов этого типа.

Исследуемая нами триптофанил-тРНК-синтетаза (КФ 6.1.1.2) из поджелудочной железы быков (M_r 120 000, a_2) обладает рядом свойств [2, 5—7], обусловленных, по-видимому, особой организацией ее АТР- и PP_i -связывающих участков. Мы предположили, что два из этих свойств — способность фермента пирофосфорилироваться и отсутствие заметного синтеза Ar_4A на ферменте — взаимосвязаны. В настоящей работе изучены АТР- и PP_i -связывающие участки бычьей триптофанил-тРНК-синтетазы с использованием фосфонатных аналогов АТР и PP_i и показано, что пирофосфорилирование фермента при образовании аденилата может быть одной из причин крайне низкой скорости синтеза Ar_4A на этом ферменте.

Материалы и методы. В работе использовали L-метилен [^{14}C]триптофан, 58 Ки/моль; [^{32}P]пирофосфат, 33 Ки/моль; [U - ^{14}C]АТР, 582 Ки/моль; [γ - ^{32}P]АТР, >5000 Ки/моль («Amersham», Англия); L-триптофан, аденозил-5'-дифосфонилфосфат (Арерр) и аденозил-5'-фосфонилдифосфонат (Арерр) («Sigma», США); динатриевую соль АТР («Reanal», ВНР); бромид цетилтриметиламмония (цетавлон), нитроцеллюлозные фильтры «Супрог» № 2 и 3 («Chemapol», СССР); сефадекс G-50 тонкий («Pharmacia», Швеция); нитроцеллюлозные фильтры марки «Millipore», США; дрожжевую неорганическую пирофосфатазу («Worthington», США); активированный уголь Norit A («Serva», ФРГ), полиэтиленмиоцеллюлозные (PEI-целлюлоза) пластины (20×20 см) с флуоресцентным индикатором UV-254 («Merck», ФРГ). Фосфонатные аналоги Ar_4A ,

содержащие остаток метилendifосфоновой кислоты между P¹- и P²-атомами (АрррррА) и между P²- и P³-атомами (АрррррА), использованные в качестве свидетелей, синтезированы, как описано в [8, 9]. Чистота всех производных нуклеотидов проверена методами жидкостной хроматографии с высоким разрешением (ВЖХ) и ³¹P-ЯМР [8, 9].

Суммарная и обогащенная до 2 % тРНК^{Т^гР} из печени быка получены, как описано в работе [10].

Препараты фермента получали по методике, описанной ранее, и перед использованием дополнительно очищали кислотным переосаждением [11]. Препарат гомогенен при электрофорезе в денатурирующих условиях. Активность фермента в реакциях АТР-[³²P]РР_i обмена и аминоацилирования тРНК^{Т^гР} определяли согласно [11]. Радиоактивность измеряли в толуоловом сцинтилляторе на счетчике «Inter technique» (Франция). Тип ингибирования и величины K_m и V определяли графическим методом Лайнуивера — Берка.

Комплексы фермента с триптофаниладенилатом получали инкубацией (10 мин, 4 °С) фермента ($1 \cdot 10^{-5}$ М) с [¹⁴C]АТР ($1 \cdot 10^{-3}$ М) и триптофаном ($1 \cdot 10^{-4}$ М) в 20 мМ буферном растворе Нерес-NaOH, рН 7,5, содержащем 10 мМ MgCl₂ и 0,1 мМ дитиотреитол в присутствии неорганической пирофосфатазы из дрожжей (0,015 мг/мл) с последующей гель-фильтрацией на колонке (25×1 см) с сефадексом G-50 (тонкий), уравновешенной тем же буфером без MgCl₂. Триптофаниладенилат-ферментный комплекс ($2-4 \cdot 10^{-6}$ М) в 0,02 М буфере Нерес-NaOH, рН 7,5, содержащем 0,1 мМ дитиотреитол, инкубировали с 2 мМ РсР или 5 мМ Арррр, или 5 мМ Арррр, или 5 мМ АТР в присутствии 10 мМ MgCl₂ при 37 °С в течение 5 ч. В определенные промежутки времени аликвоты наносили на пластины РЕИ-целлюлозы УФ-254 (20×20 см); хроматография: вода и (после высушивания на воздухе) 0,75 М LiCl, или 0,75 М КН₂РO₄, рН 3,5, или 0,8 М LiCl, содержащий 7 % Н₃ВO₃, рН 4,6. После высушивания пластины обрабатывали 20 %-ным РРО в толуоле и проводили флюорографию, используя пленку РМ-В («Тасма», СССР).

Результаты и обсуждение. Взаимодействие триптофанил-тРНК-синтетазы с метилendifосфонатом (РсР). РсР ингибирует ферментативную активность в реакции АТР-[³²P]РР_i обмена конкурентно по отношению к РР_i. Наблюдаемое ингибирование могло быть вызвано участием РсР наряду с [³²P]РР_i в ферментативной реакции, а именно взаимодействием его с триптофаниладенилатом с образованием нерадиоактивного продукта, Арррр. Чтобы проверить такую возможность, выделенный гель-фильтрацией триптофанил-¹⁴C-аденилат-ферментный комплекс обрабатывали избытками РсР и определяли образующиеся продукты ТСХ на РЕИ-целлюлозе с последующей автордиографией. Из рис. 1 видно, что в случае РсР уже в первый момент времени (1) в смеси появляется Арррр и сохраняется непрореагировавший аденилат, на что указывает радиоактивное пятно АМР (аденилат количественно превращается в АМР при фиксации его на РЕИ-целлюлозе).

Для сравнения относительных скоростей пирофосфоролиза триптофаниладенилата под действием РсР и РР_i, ведущего к образованию Арррр и АТР соответственно, измеряли кинетику триптофанзависимого расходования [γ -³²P]АТР. В отсутствие РР_i или его аналога в исследуемых условиях наблюдается расходование $\infty 1$ моля [γ -³²P]АТР на моль фермента за счет образования триптофаниладенилат-ферментного комплекса в соответствии с [12]. В присутствии избытков РР_i происходит, как видно из рис. 2 (кривая 3), быстрое снижение уровня [γ -³²P]АТР и через 10 мин реакция заканчивается за счет исчерпания радиоактивной АТР. При тех же концентрациях РсР (кривая 2) реакция протекает в $\infty 3$ раза медленнее, как следует из сравнения наклона кривых 2 и 3, в первые 3 мин после начала инкубации.

Таким образом, РсР подобно РР_i взаимодействует с триптофанил-аденилатом, но с более низкой, чем РР_i, скоростью. Ранее показано, что РсР не заменяет РР_i в реакции АТР-[³²P]РР_i обмена, катализируемой изолейцил- и аргинил-тРНК-синтетазами из дрожжей [13, 14], но служит псевдосубстратом для лизил-тРНК-синтетазы из *E. coli* [15].

На основании этого предложено использовать последний фермент для энзиматического синтеза Аррср [15]. Очевидно, что бычья триптофанил-тРНК-сингетаз, доступная в значительных количествах и относительно устойчивая, может быть также с успехом применена для препаративного получения Аррср, в том числе и радиоактивных препаратов.

Влияние РсР на пирофосфорилирование фермента. Для триптофанил-тРНК-сингетазы показано [6], что PP_i (2—3 мМ)

пирофосфорилирует фермент по одной из субъединиц, предположительно по участку, отличному от того, который занимает PP_i -субстрат при пирофосфорилировании триптофаниладенилата в реакции обмена $ATP-[^{32}P]PP_i$. Выявлена пирофосфорилируемая карбоксильная группа фермента, существенная, по-видимому, для взаимодействия его активных центров в про-

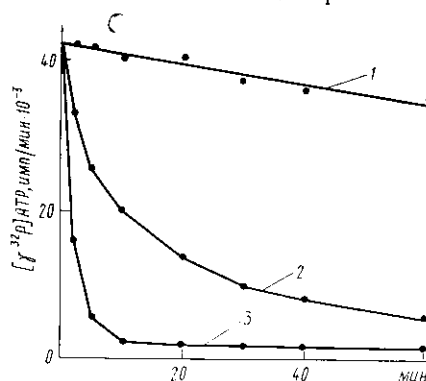
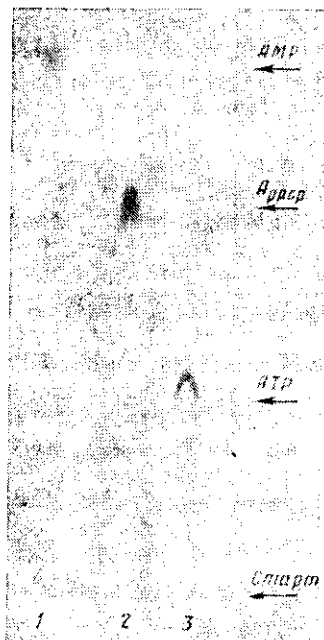


Рис. 1. Тонкослойная хроматография (ТСХ) на PEI-целлюлозе (после флюорографии) триптофанил- ^{14}C -аденилат-ферментного комплекса, инкубированного с 4 мМ РсР (1, 2) и 2 мМ PP_i (3) при 37 °С; (1, 3)—0, (2)—5 мин.

Fig. 1. Thin-layer chromatography on PEI-cellulose after fluorography of the tryptophanyl ^{14}C -adenylate-enzyme complex incubated with 4 mM РсР (1, 2) and 2 mM PP_i (3) at 37 °С; (1, 3)—0, (2)—5 min.

Рис. 2. Кинетика триптофанзависимого гидролиза $[^{32}P]ATP$ (25 мкМ) на 4,6 мкМ ферменте в отсутствие (1) и присутствии 2 мМ РсР (2) в сравнении с 2 мМ PP_i (3) при 37 °С.

Fig. 2. Kinetics of tryptophan-dependent hydrolysis of $[^{32}P]ATP$ (25 μM) with 4.6 μM enzyme without (1) and in the presence of 2 mM РсР (2) or 2 mM PP_i (3) at 37 °С.

цессе функционирования [6]. Однако ряд свойств фермента согласуется также с предположением о пирофосфорилированной форме как интермедиате триптофанзависимого $ATP-[^{32}P]PP_i$ обмена. Так, пирофосфорил-фермент способен образовывать ATP при взаимодействии с AMP [7], а AMP , в свою очередь, может накапливаться из триптофаниладенилат-ферментного комплекса за счет его превращения в триптофанил-ферментное производное [16]. При реализации такого механизма РсР, как псевдосубстрат — аналог пирофосфата, участвующего в пирофосфорилировании аденилата, должен защищать фермент от пирофосфорилирования. РсР (20 мМ) не защищает фермент от ковалентного связывания PP_i (2—3 мМ) ни при их совместном добавлении к ферменту, ни в условиях предварительной инкубации фермента с РсР (5—60 мин). Отсутствие защитного эффекта не согласуется с представлением об интермедиаторной роли пирофосфорил-фермента в реакции пирофосфорилирования аденилата и указывает на наличие на ферменте PP_i -связывающих участков, отличных от субстратных.

Фосфонатные аналоги ATP — ингибиторы триптофанзависимого $ATP-[^{32}P]PP_i$ обмена. Как видно из таблицы,

Арсрр и Арсрр эффективно ингибируют активность фермента в реакции АТР- $[^{32}P]PP_i$ обмена. Ингибирование носит конкурентный характер по отношению и к АТР, и к пиррофосфату (рис. 3). При этом в конкуренции с АТР величина K_i для Арсрр в три раза ниже величины K_m для АТР в этой реакции, а K_i для Арсрр незначительно превышает последнюю (таблица). Величины K_i , характеризующие связывание обоих соединений по пиррофосфатному участку, практически одинаковы и почти на порядок больше величины K_m , определенной для PP_i в этой реакции.

Обнаруженное связывание Арсрр и Арсрр как по АТР-, так и по PP_i -участкам активного центра может объясняться несколькими причинами. В частности, аналог может взаимодействовать с двумя субъединицами фермента: по АТР-связывающему участку одной из субъединиц и по PP_i -связывающему участку другой субъединицы, что согласуется с наблюдаемой для триптофанил-тРНК-синтетазы реакционной способностью половины активных центров при взаимодействии с субстратами и некоторыми их аналогами [1]. Однако нельзя исключить также и возможности связывания фосфонатных аналогов АТР одновременно по АТР(АМР)- и PP_i -участкам одной субъединицы фермента, как это наблюдали для мультисубстратных аналогов.

В молекуле одного из аналогов, Арсрр, сохранена достаточно реакционноспособная Р—О—Р связь, необходимая для образования интермедиа ферментативной реакции — триптофаниладенилата. Однако Арсрр практически не образует стабильных аденилатов на ферменте и не может заменять АТР в катализируемых ферментом реакциях.

Для аминоксил-тРНК-синтетаз показано, что только АТР- Mg^{2+} — субстрат этих ферментов [1]. Арсрр образует, как и АТР, Арсрр- Mg^{2+} , что приводит к выравниванию значений pK_a аналога и субстрата, значительно различающихся без Mg^{2+} (в отсутствие ионов двухвалентного металла [15]). Таким образом, отсутствие у Арсрр субстратных свойств не может быть объяснено неспособностью к образованию комплекса с Mg^{2+} или значительным отличием величины pK_a для Арсрр- Mg^{2+} от таковой для АТР- Mg^{2+} . Из семи аминоксил-тРНК-синтетаз из дрожжей, на которых был испытан Арсрр, только для фенилаланил- и лизил-тРНК-синтетаз обнаружены субстратные свойства этого аналога в полной реакции [17]. При этом максимальная скорость реакции составляла всего 0,15 % скорости для АТР, хотя величины K_i для Арсрр были более чем на порядок ниже K_m для АТР. Близкие константы получены для лейцил-тРНК-синтетазы из *E. coli* [18]. Арсрр был также плохим субстратом при образовании глициладенилата на соответствующем ферменте из *E. coli* [19]. Для ряда других аминоксил-тРНК-синтетаз Арсрр был ингибитором или вообще не взаимодействовал с ферментом [17].

Взаимодействие фосфонатных аналогов АТР с триптофаниладенилат-ферментным комплексом. Триптофанил-тРНК-синтетаза, в отличие от большинства аминоксил-тРНК-синтетаз, не катализирует с заметной скоростью синтеза Ar_4A по аденилатному механизму [3], что уже было отмечено выше. Однако мы

*Фосфонатные аналоги АТР — ингибиторы реакции АТР- $[^{32}P]PP_i$ обмена, катализируемого триптофанил-тРНК-синтетазой **

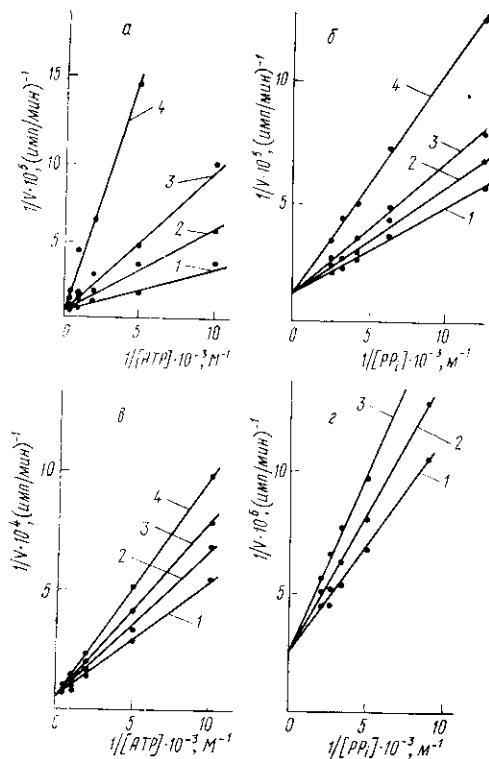
Phosphonate analogs of АТР, inhibitors of the АТР- $[^{32}P]PP_i$ exchange reaction catalyzed by tryptophanyl-tRNA synthetase

Соединение	$K_i(АТР)$, мМ	$K_i(PP_i)$, мМ
Арсрр	$0,7 \pm 0,1$	$2,6 \pm 0,2$
Арсрр	$3,6 \pm 0,2$	$2,5 \pm 0,2$

* Величина K_m для АТР в этой реакции найдена равной 2,2 мМ, для PP_i — 0,2 мМ. Величины $K_i(АТР)$ и $K_i(PP_i)$ — константы обратимого ингибирования, конкурентного в отношении АТР и PP_i соответственно, определены графически, как описано в разделе «Материалы и методы». Каждое из приведенных значений констант есть среднее из не менее чем трех определений.

установили, что изолированный триптофаниладенилат-ферментный комплекс эффективно взаимодействует с Аррсер и Арсррр с образованием фосфонатных аналогов Ар₄А, АрррррА и АрсррррА соответственно.

Триптофанил-¹⁴С-аденилат-ферментный комплекс получали в стандартных условиях в присутствии неорганической пирофосфатазы [20], выделяли гель-фильтрацией и обрабатывали каждым из аналогов АТР. В указанные на рис. 4 промежутки времени наносили аликвоты на



пластины с РЕИ-целлюлозой (20×20 см) и хроматографировали сначала в воде для удаления солей, а затем в 0,75 М LiCl. Вещества на пластине обнаруживали автордиографией и определяли их радиоактивность. Как видно из рис. 4, а в процессе инкубации триптофаниладенилат-ферментного комплекса с Аррсер происходит образование продукта их взаимодействия, АрррррА (кривая 3). При этом наблюдается постепенное сни-

Рис. 3. Зависимость скорости АТР-[³²Р]РР_i обмена в присутствии Арсррр (а, б) и Аррсер (в, г) от концентрации АТР (а, в) и РР_i (б, г) в двойных обратных координатах. Концентрации в мМ: Арсррр (а) — 1—0; 2—2,44; 3—4,88; 4—12,2; (б) — 1—0; 2—1,08; 3—2,20; 4—5,16; Аррсер (в) — 1—0; 2—0,57; 3—1,15; 4—2,90; (г) — 1—0; 2—1,18; 3—2,95.

Fig. 3. Kinetics of ATP-[³²P] PP_i exchange in the presence of Arсррр (a and б) and Аррсер (в and г) versus ATP (a and в) and РР_i (б and г) in double reciprocal plots.

жение концентрации триптофаниладенилата, что находит отражение в снижении концентрации АМР, так как при фиксации на РЕИ-целлюлозе в 0,75 М LiCl, как уже было сказано, он полностью гидролизует до АМР. Наряду с основным продуктом реакции накапливается также радиоактивная Аррсер (кривая 2), вероятно, за счет взаимодействия аденилата с РсР, образующимся путем медленного гидролиза исходной Аррсер на ферменте.

В случае Арсррр (рис. 4, б) также происходит образование радиоактивного продукта его взаимодействия с аденилатом, АрсррррА (кривая 3). Однако уже в первый момент концентрация АМР, т. е. аденилата (кривая 1), значительно снижена и появляется радиоактивная АТР (кривая 2), единственно возможный путь образования которой в условиях реакции — пирофосфоролит ¹⁴С-аденилата. Источником пирофосфата не может служить Арсррр, что вытекает из метода получения [15] и из стабильности Р—СН₂—Р связи. По-видимому, пирофосфат, взаимодействующий с аденилатом, был ранее связан на ферменте. Для триптофанил-тРНК-синтетазы показано [7], что образование триптофаниладенилат-ферментного комплекса сопровождается связыванием с белковой молекулой отщепляющегося от АТР пирофосфата лабильной фосфоангидридной связью. Можно предположить, что в присутствии Арсррр проходит гидролиз этой связи. Освободившийся пирофосфат быстро взаимодействует с триптофаниладенилатом, образуя АТР и свободный триптофан, которые, оставаясь в активном центре, вновь обра-

зуют триптофаниладенилат. На это указывают снижение во времени концентрации АТР и возрастание концентрации АМР, отражающие сложный процесс образования аденилата одновременно с частичным превращением его в АрсрррА (рис. 4, б). Отщепляющийся при повторном образовании аденилата РР_i не может, по-видимому, снова связываться с ферментом, так как находящаяся в избытке Арсрр защищает участок пирофосфорилирования и сама атакует аденилат.

На рис. 4, в приведена для сравнения кинетика взаимодействия триптофаниладенилата с АТР. Чтобы устранить возможность примеси пирофосфата в препаратах АТР, их дополнительно очищали ионообменной хроматографией на ДЭАЭ-целлюлозе или длительно инкубировали с неорганической пирофосфатазой. Из рис. 4, в видно, что в течение

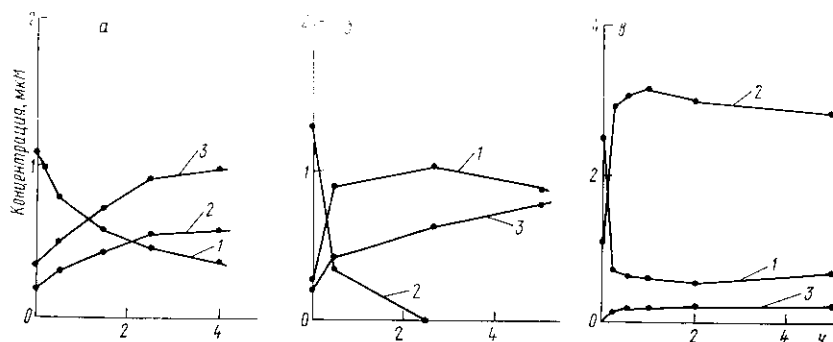


Рис. 4. Кинетика образования продуктов взаимодействия триптофанил-¹⁴С-аденилат-ферментного комплекса ($2 \cdot 10^{-5}$ М) с 5 мМ Аррср (а), Арсрр (б) и АТР (в); а: 1 — Тгр∞АМР; 2 — Аррср, 3 — АррсррА; б: 1 — Тгр∞АМР; 2 — АТР; 3 — АрсрррА; в: 1 — Тгр∞АМР; 2 — АТР; 3 — Ар₄А. Концентрации всех компонентов реакционной смеси в каждый указанный момент времени определены из данных ТСХ на РЕИ-целлюлозе, как описано в «Материалах и методах». ТСХ проводили в 0,75 М КН₂РО₄, рН 3,5 (а) и 0,75 М LiCl (б, в). Триптофаниладенилат (Тгр∞АМР), фиксированный на РЕИ-целлюлозе, количественно превращается в АМР во всех использованных системах.

Fig. 4. Kinetics of the formation of products of interaction of tryptophanyl ¹⁴C-adenylate-enzyme complex ($2 \cdot 10^{-5}$ M) with 5 mM Arpcp (a), Arpcpp (б) and ATP (в).

5 ч Ар₄А почти не образуется. Наблюдается медленное снижение концентрации аденилата с одновременным возрастанием концентрации радиоактивной АТР, что отражает, по-видимому, взаимодействие аденилата с пирофосфатом, медленно освобождающимся из связи с ферментом в процессе инкубации с АТР.

Таким образом, АТР в отличие от своих фосфонатных аналогов, не может, очевидно, быстро вытеснить связанный с ферментом пирофосфат, а также конкурировать с пирофосфатом за аденилат на ферменте. Это находится в полном соответствии с крайне низкой скоростью синтеза Ар₄А на ферменте в условиях образования триптофаниладенилат-ферментного комплекса.

Рассмотренные данные позволяют заключить, что обнаруженное ранее для триптофанил-гРНК-синтетазы пирофосфорилирование в процессе образования триптофаниладенилат-ферментного комплекса [7] может быть одним из факторов, предотвращающих синтез Ар₄А *in vitro* на этом ферменте. Вопрос о том, относится ли это заключение к функционированию фермента *in vivo* и каков его физиологический смысл, выходит за рамки данной работы.

Авторы глубоко признательны Л. Л. Киселеву за полезные советы; Н. Б. Тарусовой — за предоставление препаратов фосфонатных аналогов Ар₄А; А. В. Ажасву — за проверку чистоты нуклеотидных препаратов методом жидкостной хроматографии с высоким разрешением.

Авторы также благодарят О. О. Фаворову за полезные замечания по рукописи статьи.

STUDY OF ATP AND PYROPHOSPHATE-BINDING SITES
OF TRYPTOPHANYL-tRNA SYNTHETASE BY PHOSPHONATE ANALOGS
OF ATP AND PYROPHOSPHATE

T. I. Merkulova, M. K. Nurbekov, G. K. Kovaleva

Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

Summary

ATP and pyrophosphate-binding sites of bovine tryptophanyl-tRNA-synthetase were studied by phosphonate analogs of ATP and inorganic pyrophosphate — adenosyl-5'-phosphoryldiphosphonate (Appcp), adenosyl-5'-diphosphonylphosphate (Apcpp) and methylenediphosphonate (PcP). Methylenediphosphonate can fulfil the role of PP_i in the reaction of tryptophanyl adenylate pyrophosphorolysis with the formation of Appcp, the only product of the reaction. Phosphonate analogs of ATP inhibit the reaction of tryptophan-dependent ATP- $[^{32}P]PP_i$ exchange competitively with respect both to ATP ($K_i \sim 0.7$ mM for Apcpp and ~ 3.6 mM for Appcp) and PP_i ($K_i \sim 2.5$ mM for both inhibitors). The two analogs interact with the isolated tryptophanyl adenylate-enzyme complex, corresponding phosphonate analogs of Ap_4A being formed. On the basis of the results obtained an assumption is made that the observed earlier enzyme pyrophosphorylation by pyrophosphate, which is cleft from ATP in the course of adenylate formation, may be one of the factors preventing the synthesis of Ap_4A on tryptophanyl-tRNA synthetase.

1. Киселев Л. Л., Фаворова О. О., Лаврик О. И. Биосинтез белков от аминокислот до аминоацил-тРНК.— М.: Наука, 1984.—408 с.
2. Zamecnik P. Diadenosine 5', 5'''- P^1 , P^4 -tetrphosphate (Ap_4A): its role in cellular metabolism // *Analyt. Biochem.*—1983.—134, N 1.— P. 1—10.
3. Blanquet S., Plateau P., Brevet A. The role of zinc in 5', 5'-diadenosine tetrphosphate production by aminoacyl-transfer RNA synthetases // *Mol. and Cell. Biochem.*—1983.—52, N 1.— P. 3—11.
4. Goerlich O., Foexler R., Holler E. Mechanism of synthesis of adenosine(5')tetraphosphate(5')adenosine (AppppA) by aminoacyl-tRNA synthetases // *Eur. J. Biochem.*—1982.—126, N 1.— P. 135—142.
5. Tryptophanyl-tRNA synthetase and pyrophosphate / G. K. Kovaleva, E. G. Holmuratov, M. K. Nurbekov et al. // *Ric. sci.*—1984.—113.— P. 125—132.
6. Получение и свойства пирофосфорилированной формы триптофанил-тРНК-синтетазы / Г. К. Ковалева, М. К. Нурбеков, Т. И. Меркулова, Л. Л. Киселев // *Биоорг. химия.*—1983.—9, № 7.— С. 947—958.
7. Kovaleva G. K., Holmuratov E. H., Kisselev L. L. Tryptophanyl-tRNA synthetase: pyrophosphorylation of the enzyme in the course of adenylate formation? // *FEBS Lett.*—1983.—151, N 1.— P. 79—82.
8. Тарусова Н. Б., Завгородний С. Г., Осипова Т. И. Фосфоорганические аналоги биологически активных соединений. XIV. Синтез фосфонатных аналогов P^1 , P^4 -бис(5'-аденозил)-тетрафосфата и 5'-нуклеозидтрифосфатов // *Биоорг. химия.*—1985.—11, № 6.— С. 802—807.
9. Phosphonate analogs of nucleotide-5'-triphosphates and P^1 , P^4 -diadenosinetetraphosphate / N. B. Tarusova, T. I. Osipova, A. I. Biriukov et al. // *Nucl. Acids Res., Symp. Ser.*—1984.— N 14.— P. 287—288.
10. Roy K. L., Söll D. Fractionation of *Escherichia coli* transfer RNA on benzoylated DEAE-cellulose // *Biochim. et biophys. acta.*—1968.—161, N 2.— P. 572—574.
11. Kisselev L. L., Favorova O. O., Kovaleva G. K. Tryptophanyl-tRNA synthetase from beef pancreas // *Meth. Enzymol.*—1979.—59, part G.— P. 234—257.
12. Active site titration and aminoacyl adenylate binding stoichiometry of aminoacyl-tRNA synthetases / A. R. Fersht, J. B. Ashford, C. J. Bruton et al. // *Biochemistry.*—1975.—14, N 1.— P. 1—4.
13. Freist W., Von der Haar F., Cramer F. Isoleucyl-tRNA synthetase from Baker's yeast. Action of ATP analogs in pyrophosphate exchange and aminoacylation, two pathways of the aminoacylation depending on concentration of pyrophosphate // *Eur. J. Biochem.*—1981.—119, N 1.— P. 151—184.
14. Freist W., Sternbach H., Cramer F. Arginyl-tRNA synthetase from Baker's yeast. Order of substrate addition and action of ATP analogs in the aminoacylation reaction; influence of pyrophosphate on the catalytic mechanism // *Ibid.*—1981.—119, N 3.— P. 477—482.
15. Yount R. G. ATP analogs // *Adv. Enzymol. and Related Areas Mol. Biol.*—1975.—43.— P. 1—50.
16. Триптофанил-тРНК-синтетаза: выделение и характеристика триптофанил-фермента / О. О. Фаворова, Г. К. Ковалева, С. Г. Мороз, Л. Л. Киселев // *Молекуляр. биология.*—1978.—12, № 8.— С. 588—601.

17. Freist W., Wiender H., Cramer F. Chemically modified ATP derivatives for the study of aminoacyl-tRNA synthetases from Baker's yeast: ATP analogs with fixed conformations or modified triphosphate chains in the aminoacylation reaction // Bioorg. Chem.—1980.—9, N 4.— P. 491—504.
18. Marytzyk R., Flossdorf J., Kula M.-R. ATP analogs as substrates for the leucyl-tRNA synthetase from *Escherichia coli* MRE 600 // Nucl. Acids Res.—1976.—3, N 8.— P. 2067—2077.
19. Led J. J., Switon W. K., Jensen K. F. Phosphorolytic activity of *Escherichia coli* glycyl-tRNA synthetase towards its cognate aminoacyl adenylate detected by ³¹P-NMR spectroscopy and thin-layer chromatography // Eur. J. Biochem.—1983.—136, N 3.— P. 469—479.
20. Ковалева Г. К., Дегтярев С. Х., Фаворова О. О. Аффинная модификация триптофанил-тРНК-синтетазы алкилирующим аналогом триптофана // Молекуляр. биология.—1979.—13, № 6.— С. 1237—1246.

Ин-т молекуляр. биологии АН СССР,
Москва

Получено 25.07.85

УДК 577.112.853.083

ФРАГМЕНТ К 2—3 МОЛЕКУЛЫ ПЛАЗМИНОГЕНА СОДЕРЖИТ ЛИЗИНСВЯЗЫВАЮЩИЙ УЧАСТОК

В. В. Повохатний, Ю. В. Мацука, С. А. Кудинов

Введение. Плазминоген, неактивный предшественник фибринолитического фермента плазмина, представляет собой одноцепочечный гликопротеид с молекулярной массой 92 000. Его единственная полипептидная цепь состоит из 790 аминокислотных остатков с известной первичной последовательностью [1]. При активации плазминогена в плазме образуются тяжелая и легкая цепи, соединенные между собой двумя дисульфидными связями [1—3]. Легкая цепь плазмина содержит активный центр и гомологична трипсину и другим сериновым протеазам [2]. В составе тяжелой цепи плазмина имеется пять гомологичных трехпетлевых структур (кринглов) [4], имеющих молекулярную массу около 10 000 и состоящих примерно из 80 аминокислотных остатков. Стабильность этих структур обеспечивается тремя дисульфидными связями. Кринглы ответственны за способность плазминогена и плазмина специфически связывать лизин и некоторые другие ω-аминокарбоновые кислоты [5]. Согласно современным представлениям лизинсвязывающие участки играют решающую роль в регуляции физиологического фибринолиза [6]. Ими опосредуется взаимодействие плазминогена и плазмина с фибрином и α₂-антиплазмином.

Несмотря на интенсивное изучение лизинсвязывающих свойств плазминогена, до настоящего времени строго не установлено количество связывающих участков в его молекуле. С помощью ограниченного протеолиза плазминогена показано [4, 7], что лизинсвязывающие участки имеются в первом и четвертом кринглах. На основании изучения химической природы лизинсвязывающего участка четвертого крингла и гомологичности крингловых структур Трекслер и соавт. [8] предположили существование участка со слабым сродством к лизину во втором крингле. Экспериментальным подтверждением этого предположения явились данные по плавлению плазминогена и его фрагментов [9]. В этой работе нами было показано, что ε-аминокапроновая кислота оказывает специфическое стабилизирующее действие на структуру первого, второго и четвертого кринглов. Однако строгое доказательство присутствия лизинсвязывающего участка во втором крингле можно получить лишь имея эту структуру в изолированном виде.

В настоящем сообщении приводятся результаты экспериментов, указывающих на присутствие лизинсвязывающего участка во фрагменте К 2—3 молекулы плазминогена.