



УДК 577.152.361\*1'134

КАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НЕОРГАНИЧЕСКОЙ  
ПИРОФОСФАТАЗЫ С МОДИФИЦИРОВАННЫМИ  
РЕГУЛЯТОРНЫМИ ЦЕНТРАМИ

Воробьева Н. Н., Назарова Т. И., Аваева С. М.

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,  
Межфакультетская проблемная научно-исследовательская лаборатория  
молекулярной биологии и биоорганической химии им. А. Н. Белозерского

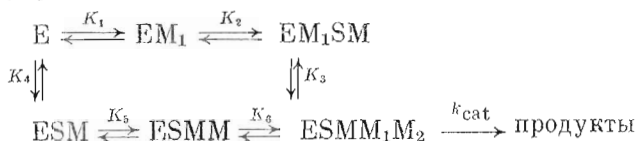
Изучены каталитические свойства модифицированного производного неорганической пирофосфатазы дрожжей, которое получено превращением карбоксильной группы регуляторного центра фермента в гидроксамат. Такое производное способно гидролизовать субстраты и синтезировать пирофосфат так же, как и нативный фермент. В состав продуктивного комплекса, образованного модифицированным ферментом и превращающегося в продукты реакции при гидролизе пирофосфата, входят два катиона-активатора ( $Mg^{2+}$ ) и молекула субстрата ( $MgPP$ ), как это имеет место в случае нативной пирофосфатазы. Однако пути образования продуктивного комплекса для нативной и модифицированной пирофосфатазы различаются, так как в случае модифицированной фермента ионы магния могут связываться с центром высокого сродства к катионам-активаторам только в присутствии субстрата. В модифицированной пирофосфатазе этот центр не способен присоединять ионы кальция в отсутствие пирофосфата и имеет пониженное сродство к катионам цинка.

Неорганическая пирофосфатаза (КФ 3.6.1.4) катализирует гидролиз пирофосфата в присутствии катионов двухвалентных металлов. Фермент представляет собой димер, состоящий из двух химически идентичных субъединиц, каждая из которых имеет активный и регуляторный центры [1, 2]. Взаимодействие пирофосфатазы с гидроксидами приводит к модификации карбоксильной группы активного центра и, как следствие, к необратимому ингибированию фермента [3], а реакция с фосфатом — к фосфорилированию карбоксильной группы регуляторного центра, которое не сопровождается уменьшением ферментативной активности [4]. Ранее был разработан путь получения производной пирофосфатазы, в котором карбоксильная группа каждого регуляторного центра, способная присоединять фосфат, превращалась в гидроксамат в условиях, исключаящих модификацию активного центра [4]. Такое производное фермента может быть использовано для выяснения функциональной значимости регуляторного центра. Однако проведение такого рода исследований требует ответа на вопрос: как модификация регуляторного центра сказывается на каталитических свойствах фермента, взаимодействии его с катионами двухвалентных металлов и способности синтезировать пирофосфат? Получение необходимых данных и явилось целью настоящей работы.

Модифицированный по регуляторному центру фермент сохраняет способность к гидролизу субстрата ( $MgPP$ ) [4]. Кинетические параметры этого процесса были получены из зависимостей начальной скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата при нескольких фиксированных концентрациях свободной формы ионов магния (рис. 1). Эти результаты позволили сделать вывод, что модификация регуляторного центра не меняет сродства фермента к субстрату ( $K_m$  7 мкМ), но несколько уменьшает значение максимальной скорости гидролиза ( $V$  570 МЕ); для нативного фермента эти величины составляют 7 мкМ и 650 МЕ.

Для установления схемы кинетического процесса были построены вторичные графики зависимости наклона прямых на рис. 1 ( $K_2/V_{эф}$ ) и отрезка, отсекаемого на оси ординат ( $1/V_{эф}$ ), от обратной концентрации катиона-активатора (рис. 2). Полученные результаты удовлетворительно опи-

связываются схемой



где  $E$  — фермент,  $M_1$  и  $M_2$  — катионы  $Mg^{2+}$ , присоединяющиеся к ферменту в разных центрах,  $SM$  — субстрат ( $MgPP$ ). Если предположить, что оба пути образования продуктивного комплекса равноценны, то уравнение скорости процесса, протекающего по этой схеме, будет следующим:

$$1/v = K_2/V [SM] \left( \frac{K_1 K_3}{2[M]^2} + \frac{K_3}{2[M]} \right) + \frac{1}{V} \left( \frac{K_5 K_6}{2[M]^2} + \frac{K_3 + K_6}{2[M]} + 1 \right).$$

При фиксированной концентрации свободной формы ионов магния это уравнение описывает прямую линию

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{эф}} + \frac{K_2}{V_{эф}} \frac{1}{[SM]}$$

с параметрами

$$\begin{aligned}
 \frac{1}{V_{эф}} &= \frac{1}{V} \left( \frac{K_5 K_6}{2[M]^2} + \frac{K_3 + K_6}{2[M]} + 1 \right), \\
 \frac{K_2}{V_{эф}} &= \frac{K_2}{V} \left( \frac{K_1 K_3}{2[M]^2} + \frac{K_3}{2[M]} \right).
 \end{aligned}$$

Полученные результаты показывают, что общие закономерности гидролиза  $MgPP$ , выявленные для нативного фермента [5], сохраняются и в случае модифицированного. Так, состав продуктивного комплекса в обоих случаях одинаков и включает два иона металла-активатора и молекулу субстрата —  $MgPP$ . Основным отличием новой схемы от предложенной ранее для нативной пирофосфатазы является отсутствие комплекса фермента с двумя ионами магния. Второй катион металла-активатора присоединяется к модифицированному ферменту лишь после связывания  $MgPP$ . Этот факт, по-видимому, является причиной параболического характера зависимости  $1/V_{эф}$  от обратной концентрации ионов магния в отличие от линейной зависимости, полученной ранее для нативного фермента [5]. Линейный же характер зависимости  $K_2/V_{эф}$  от квадрата обратной

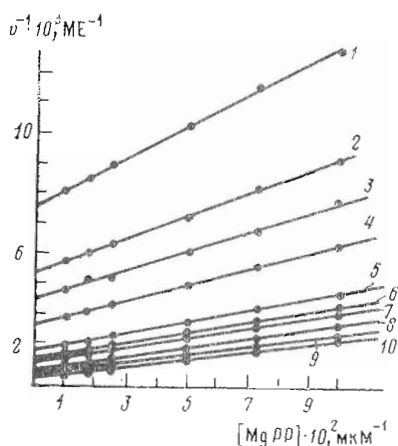


Рис. 1

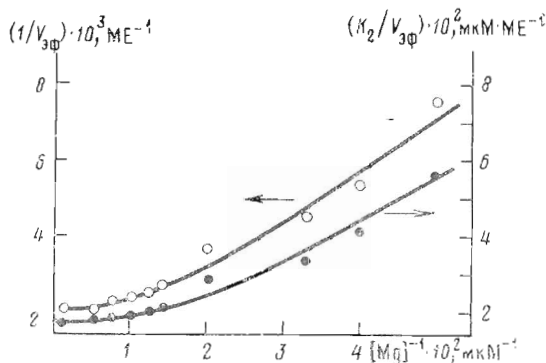


Рис. 2

Рис. 1. Зависимость начальной скорости гидролиза пирофосфата от концентрации комплекса  $MgPP$  при концентрации свободной формы ионов магния, равной ( $\mu M$ ) 20 (1), 25 (2), 33 (3), 50 (4), 70 (5), 80 (6), 100 (7), 133 (8), 200 (9) и 1000 (10)

Рис. 2. Зависимость параметров прямых на рис. 1 от обратной концентрации ионов  $Mg^{2+}$

Связывание ионов металлов нативной и модифицированной пирофосфатазой

Добавленный лиганд	Концентрация фермента, мкМ		Концентрация добавленного лиганда, мМ		Содержание ионов металла, моль/моль субъединицы фермента	
	нативного	модифицированного	ионы металла	PP <sub>i</sub>	нативного	модифицированного
Ca <sup>2+</sup>	44,6–48,1	29,3–34,5	0,1	—	0,06±0,1	0,035±0,1
			0,4	—	0,1±0,1	0,57±0,1
			0,7	—	0,25±0,1	0,65±0,1
			1,0	—	0,58±0,1	0,70±0,1
			1,5	—	1,02±0,1	0,80±0,1
			2,0	—	2,05±0,15	0,90±0,1
			3,0	—	2,07±0,1	0,85±0,1
Ca <sup>2+</sup> +PP <sub>i</sub>	44,6–48,1	29,3–34,5	0,122	0,072	0,45±0,15	0,37±0,1
			0,486	0,137	1,25±0,15	0,70±0,1
			0,852	0,202	1,50±0,1	1,15±0,1
			1,22	0,267	2,05±0,1	2,65±0,1
			1,83	0,376	2,40±0,1	2,82±0,1
			2,43	0,485	2,87±0,1	2,82±0,1
Zn <sup>2+</sup>	106,7	44,6	0,7	—	1,04±0,1	0,10±0,1
			1,0	—	1,60±0,1	0,25±0,1
			1,5	—	—	2,20±0,1
			2,0	—	2,40±0,1	2,50±0,1
			3,0	—	2,75±0,1	2,85±0,1
			5,0	—	2,75±0,1	—

концентрации ионов магния (в статье не приведено) свидетельствует о том, что содержание формы EM,SM в смеси мало, т. е. присоединение субстрата к ферменту способствует заполнению ионами магния второго центра.

Правильность вывода об изменении порядка связывания лигандов в случае модифицированной по регуляторному центру пирофосфатазы (схема) подтверждается определением числа ионов кальция, связывающихся с модифицированным и нативным ферментами, проведенным методом равновесного диализа (таблица). Результаты, представленные в таблице, показывают, что в отсутствие субстрата модифицированная пирофосфатаза связывает только один ион кальция в расчете на субъединицу, нативный фермент в аналогичных условиях присоединяет два иона. Картина меняется в присутствии пирофосфата. В этом случае модифицированный фермент, как и нативный, способен присоединять три катиона кальция, один из которых участвует в образовании пирофосфата кальция [6]. Можно думать, что порядок заполнения центров в случае ионов магния и кальция одинаков, так как последние ингибируют фермент, заменяя Mg<sup>2+</sup> во всех центрах его связывания на ферменте [6].

Число мест связывания ионов цинка (таблица) в модифицированном и нативном ферментах в отсутствие субстрата одинаково и равно трем в расчете на субъединицу. Однако сродство ионов цинка к одному из центров связывания в модифицированном ферменте существенно ухудшается.

Из данных по равновесному диализу следует, что в модифицированной по регуляторному центру пирофосфатазе, по-видимому, нарушено взаимодействие ионов кальция с центрами низкого сродства, а ионов цинка — с центрами высокого сродства. Следует, однако, иметь в виду, что каждая субъединица пирофосфатазы имеет два центра связывания ионов магния: с низким ( $K_d \approx 200$  мкМ) и высоким сродством ( $K_d \approx 20$  мкМ) [7]. Но сродство ионов металлов к каждому из двух центров связывания в пирофосфатазе принципиально отличается для различных активаторов. Так, центр, обладающий высоким сродством к Mg<sup>2+</sup> и Zn<sup>2+</sup>, плохо связывает ионы кальция, и, наоборот, центр, обладающий низким сродством к Mg<sup>2+</sup> и Zn<sup>2+</sup>, хорошо связывает Ca<sup>2+</sup> [8].

Для ответа на вопрос, какой из центров связывания катионов магния формируется в модифицированном ферменте под действием субстрата,

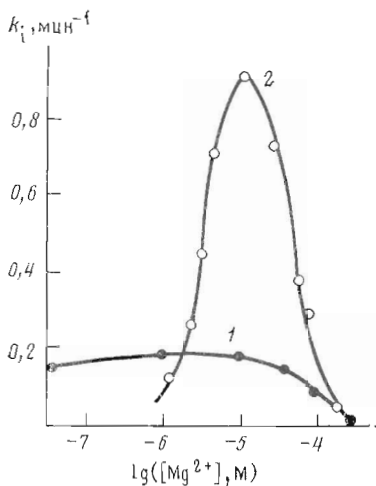


Рис. 3

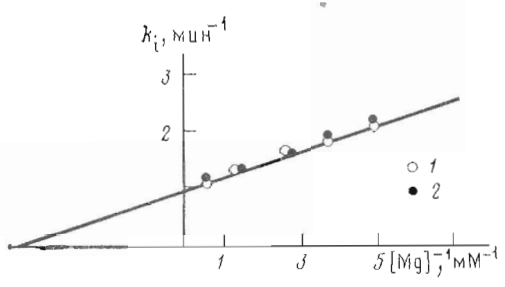


Рис. 4

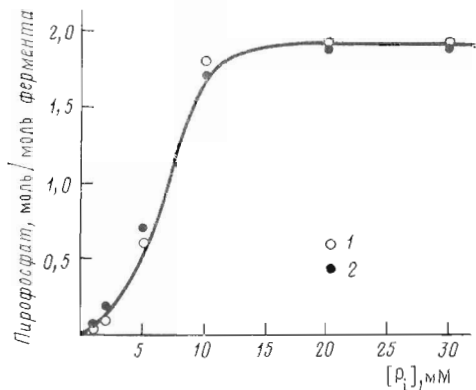


Рис. 5

Рис. 3. Ингибирование гидроксиламином модифицированной (1) и нативной (2) пирофосфатазы при разных концентрациях ионов магния.  $k_i$  — константа скорости ингибирования первого порядка

Рис. 4. Зависимость инактивации модифицированной (1) и нативной (2) пирофосфатазы под действием субтилизина от концентрации ионов  $Mg^{2+}$

Рис. 5. Зависимость количества синтезированного модифицированным (1) и нативным (2) ферментами пирофосфата от концентрации фосфата

изучено взаимодействие модифицированного по регуляторному центру фермента с гидроксиламином при разных концентрациях  $Mg^{2+}$ . Ранее было показано, что ингибирование пирофосфатазы гидроксиламином зависит от концентрации ионов магния в среде и максимально при заполнении центра с высоким сродством к катиону-активатору, насыщение же центра с низким сродством, наоборот, оказывает защитный эффект [3]. Принципиальные результаты были получены при изучении ингибирования гидроксиламином фермента с модифицированным регуляторным центром (рис. 3). Увеличение концентрации ионов магния вплоть до  $5 \cdot 10^{-5}$  M не влияло на процесс ингибирования и лишь при концентрации  $>10^{-4}$  M ионы магния защищали пирофосфатазу от действия гидроксилamina. Одной из причин такого влияния ионов магния могла быть неспособность катионов-активаторов связываться с центром высокого сродства модифицированного по регуляторному центру фермента.

Это предположение подтвердилось при изучении влияния различных концентраций ионов магния на протеолиз субтилизином модифицированной и нативной пирофосфатазы (рис. 4). Оказалось, что добавление ионов магния снижает скорость инактивации пирофосфатазы под действием субтилизина. При этом величины констант диссоциации комплексов нативного и модифицированного ферментов с ионами магния оказались одинаковыми и составили 230 мкM, т. е. в обоих случаях наблюдаемый защитный эффект является следствием заполнения центра низкого сродства к  $Mg^{2+}$ . Следовательно, модификация регуляторного центра не повлияла на этот центр связывания ионов металла.

Таким образом, из совокупности результатов, полученных при изуче-

нии кинетики гидролиза пирофосфата магния модифицированным по регуляторному центру ферментом, ингибирования его гидроксиламино и протеолиза субтилизином, а также при проведении экспериментов по равновесному диализу такого фермента с ионами металлов, следует, что модификация регуляторного центра нарушает в отсутствие субстрата взаимодействие катионов с центром высокого сродства к ионам магния. При присоединении же к модифицированной пирофосфатазе субстрата у центра высокого сродства восстанавливается способность связывать ионы активатора. Неспособность ионов магния связываться в центре высокого сродства, возможно, объясняется тем, что подвергающаяся модификации карбоксильная группа регуляторного центра находится вблизи центра связывания иона металла и контактирует с одним из его лигандов. Известно, что именно этот ион металла имеет прямой контакт с субстратом [9]. Вероятно, поэтому присутствие субстрата делает возможным присоединение катиона-активатора в центре высокого сродства модифицированного по регуляторному центру фермента.

Скорость протеолиза субтилизином очень чувствительна к конформации белковой молекулы. Поэтому тот факт, что протеолиз нативной и модифицированной пирофосфатазы протекает одинаково, свидетельствует об отсутствии существенных конформационных изменений в молекуле фермента в результате модификации регуляторного центра гидроксиламино.

Неорганическая пирофосфатаза способна не только гидролизовать, но и синтезировать пирофосфат из фосфата в присутствии двухвалентных катионов [2]. Если в реакционную смесь, содержащую фермент и фосфат, добавлять фторид-ионы, выступающие эффективными ингибиторами пирофосфатазы на стадии образования фермент-субстратного соединения, удается выделить комплекс фермента, содержащий в активном центре пирофосфат [10]. Такой подход был применен при изучении возможности синтеза пирофосфата из фосфата под действием производного фермента с модифицированным регуляторным центром. Результаты, представленные на рис. 5, свидетельствуют о полном сходстве процессов синтеза пирофосфата в активном центре нативного и модифицированного ферментов, т. е. модификация регуляторного центра не сказывается на синтетической активности пирофосфатазы.

Итак, модификация регуляторного центра пирофосфатазы гидроксиламино не приводит к существенным изменениям ее каталитических свойств и не вызывает значительных конформационных изменений в молекуле фермента. Следовательно, такое производное пирофосфатазы может служить удобным инструментом при изучении роли регуляторного центра в функционировании фермента. Этому вопросу будет посвящена следующая публикация, в которой будет показано, что модификация регуляторного центра пирофосфатазы приводит к нарушению взаимодействия субъединиц в составе димера.

### Экспериментальная часть

Неорганическая пирофосфатаза из пекарских дрожжей была получена по методу [11] и имела активность 650 МЕ/мг. Концентрацию фермента измеряли спектрофотометрически при 280 нм [12]. Ферментативную активность определяли согласно [13].

В работе использовали субтилизин, Нерес (N-2-оксиэтилпиперазин-N'-2-этансульфоновую кислоту), Pipes (пиперазин-N,N'-бис-2-этансульфоновую кислоту) фирмы Sigma; радиоактивный  $[Ca^{45}]Cl_2$  без носителя (Amersham); остальные реактивы были отечественного производства марки ос.ч. или х.ч. Трис и солянокислый гидроксиламин использовали после перекристаллизации из этанола. Все растворы готовили на бидистиллированной воде.

Для получения пирофосфатазы с модифицированными регуляторными центрами 15–20 мкМ фермент выдерживали 15 мин при 20° С в 0,05 М трис-HCl-буфере, pH 7,2, с 2 мМ  $NaH_2PO_4$  и 5 мМ  $MgCl_2$  и 50 мин при 30° С с 2 М гидроксиламино. Модифицированный фермент выделяли дву-

кратной гель-фильтрацией с центрифугированием на колонке объемом 1 мл по методу [14].

*Кинетику гидролиза пироглосфата магния* под действием модифицированной пироглосфатазы ( $5 \cdot 10^{-10}$  М) изучали при  $25^\circ\text{C}$  в 0,1 М трис-НСI-буфере, рН 7,2 или 0,1 М Нерес-NaOH, рН 7,2 при концентрациях  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  14,4 мкМ — 964 мкМ и  $\text{MgCl}_2$  20 мкМ — 1,17 мМ. Концентрации  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  и  $\text{MgCl}_2$  варьировали таким образом, что концентрация  $\text{MgPP}$  составляла 10—100 мкМ при концентрации свободной формы ионов магния 20 мкМ — 1 мМ. Для расчета концентраций свободных форм ионов  $\text{Mg}^{2+}$ , пироглосфата и комплексов  $\text{MgPP}$  и  $\text{Mg}_2\text{PP}$  использовали значения констант диссоциации комплексов 86,4 мкМ и 2,84 мМ соответственно [15]. Начальные скорости гидролиза определяли на автоматическом анализаторе фосфата, работающем в непрерывном режиме [13]. Реакцию проводили в термостатируемом сосуде, снабженном магнитной мешалкой. Объем реакционной смеси 5 мл. Кинетические параметры оценивали графически.

*Ингибирование* нативной и модифицированной пироглосфатазы *гидроксиламино*м в присутствии различных концентраций  $\text{Mg}^{2+}$  проводили как описано в работе [3].

*Равновесный диализ* осуществляли в кювете для микродиализа объемом 100 мкл, разделенной на две равные части диализной мембраной, в 0,05 М трис-НСI-буфере, рН 7,2, в случае  $^{45}\text{CaCl}_2$  и в 0,1 М Pipes, рН 6,5, в случае  $\text{ZnCl}_2$ . Равные объемы растворов белка и лиганда помещали по разные стороны мембраны, ячейку плотно закрывали и оставляли на 16 ч при  $4^\circ\text{C}$ . Предварительные опыты показали, что этого времени достаточно для установления равновесия. Концентрацию лиганда варьировали от 0,1 до 5 мМ, концентрацию белка — от 30 до 100 мкМ, концентрация свободного  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  была 50 мкМ. При расчете общих концентраций использовали значение константы диссоциации для  $\text{CaPP}$ , равное 0,229 мМ [15]. Концентрация фермента во время диализа практически не менялась. Концентрацию  $^{45}\text{CaCl}_2$  в обеих частях ячейки определяли с помощью жидкостно-сцинтилляционного счетчика LKB (Швеция).

Для определения концентрации ионов цинка [16] к 0,5 мл 2% фталатного буфера, рН 9,0, добавляли 15 мкл исследуемого раствора и 30 мкл 0,1% раствора «цинкона» в 0,02 н. NaOH. Поглощение измеряли при 625 нм на спектрофотометре Spesol-20 (ГДР). Концентрацию ионов цинка определяли по калибровочной прямой.

*Протеолиз субтилизин*ом изучали в 0,1 М буфере Нерес-NaOH, рН 7,8, при  $37^\circ\text{C}$ . К 0,15—0,20 мкМ раствору фермента, содержащему 0—5 мМ  $\text{MgCl}_2$ , добавляли субтилизин до концентрации 0,24 мг/мл. Через определенные промежутки времени отбирали аликвоты и определяли пироглосфатазную активность. Для расчета констант скоростей реакции строили график зависимости логарифма остаточной активности от времени, затем определяли константы скоростей первого порядка как  $k=0,693/\tau_{0,5}$ , где  $\tau_{0,5}$  — время полуреакции.

*Синтез пироглосфата* из  $\text{P}_i$  в активном центре модифицированной и нативной пироглосфатазы ( $5 \cdot 10^{-7}$  М) проводили в присутствии 1 мМ  $\text{MgCl}_2$  и 1—30 мМ  $\text{NaH}_2\text{[}^{32}\text{P]O}_4$  в 0,05 М трис-НСI-буфере, рН 7,2, добавляли NaF до концентрации 1 мМ и выделяли полученный комплекс гель-фильтрацией [10].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бакулева П. П., Костенко Е. Б., Байков А. А., Аваева С. М. Биохимия, 1981, т. 46, № 5, с. 832—840.
2. Bakuleva N. P., Nazarova T. I., Baykov A. A., Awaeva S. M. FEBS Let., 1981, v. 124, № 2, p. 245—247.
3. Аваева С. М., Воробьева И. Н., Мельник М. С., Назарова Т. И. Биоорган. химия, 1979, т. 5, № 10, с. 1570—1578.
4. Водовозова Е. Я., Воробьева И. Н., Комиссаров А. А., Назарова Т. И., Аваева С. М. Биоорган. химия, 1982, т. 8, № 2, с. 187—190.
5. Braga E. A., Awaeva S. M. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1972, v. 49, № 2, p. 528—535.
6. Baykov A. A., Awaeva S. M. Eur. J. Biochem., 1974, v. 47, № 1, p. 57—66.
7. Baykov A. A., Tam-Villoslado J. J., Duzenko V. S., Panchenko L. A., Awaeva S. M. Biochim. et biophys. acta, 1979, v. 569, № 1, p. 228—238.

8. Braga E. A., Avaeva S. M. FEBS Lett., 1972, v. 27, № 2, p. 251–255.
9. Куранова Н. П., Терзян С. С., Воронова А. А., Смирнова Е. А., Вайнштейн Б. К., Хене В., Хаусен Г. Биооргани. химия, 1983, т. 9, № 12, с. 1611–1619.
10. Бакулева Н. П., Байков А. А., Авасва С. М. Биохимия, 1981, т. 46, № 9, с. 1974–1979.
11. Брага Э. А., Байков А. А., Авасва С. М. Биохимия, 1973, т. 38, № 2, с. 344–350.
12. Kunitz M. Arch. Biochem. and Biophys., 1980, v. 92, № 1, p. 270–272.
13. Байков А. А., Авасва С. М. Anal. Biochem., 1981, v. 116, № 1, p. 1–4.
14. Penefsky H. J. J. Biol. Chem., 1977, v. 257, № 9, p. 2891–2899.
15. Volk S. E., Baykov A. A., Duzenko V. S., Avaeva S. M. Eur. J. Biochem., 1982, v. 125, № 1, p. 215–220.
16. Fries J., Getrost M. In: Organic reagents for trace analysis. Darmstadt: E. Merck, 1977, p. 412–413.

Поступила в редакцию

26.II.1985

После доработки

19.IV.1985

## CATALYTIC PROPERTIES OF INORGANIC PYROPHOSPHATASE WITH MODIFIED REGULATORY CENTRES

VOROBYEVA N. N., NAZAROVA T. I., AVAEVA S. M.

*A. N. Belozersky Laboratory of Molecular Biology and Bioorganic Chemistry, M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow*

A baker's yeast inorganic pyrophosphatase derivative has been obtained in which one carboxyl group of each regulatory centre is converted to hydroxamate. This enzyme retains the capacity to hydrolyze substrates and synthesize pyrophosphate. As in the case of the native enzyme, the productive complex includes two activator cations ( $Mg^{2+}$ ) and a substrate molecule ( $MgPP$ ). However, the pathway of productive complex formation differs for the modified enzyme. Such a conclusion follows from the fact that  $Mg^{2+}$ , having high affinity for pyrophosphatase, cannot bind to the enzyme in the absence of the substrate. This centre also fails to bind  $Ca^{2+}$  and has lower affinity for  $Zn^{2+}$ .