



УДК 577.153.35

ГЕКСАМЕРНАЯ, ТРИМЕРНАЯ, ДИМЕРНАЯ И МОНОМЕРНАЯ ФОРМЫ НЕОРГАНИЧЕСКОЙ ПИРОФОСФАТАЗЫ *Escherichia coli*

© 2002 г. Ю. П. Вайнонен^{*,#}, С. А. Курилова^{**}, С. М. Аваева^{**}

* Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Химический факультет, 119899, Москва, Воробьевы горы;

** Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ, Москва
Поступила в редакцию 30.07.2001 г. Принята к печати 20.12.2001 г.

Для неорганической пирофосфатазы *Escherichia coli*, являющейся гомогексамером, найдены условия получения тримерной, димерной и мономерной форм. Изучены взаимные переходы олигомеров, определены константы скоростей диссоциации и ассоциации. Установлено, что формы обладают каталитической активностью, уменьшающейся в ряду: гексамер–тример–димер–мономер. Тримерная и димерная формы проявляют активность, достаточную для изучения и сопоставления их каталитических свойств. Мономерная форма фермента неустойчива.

Ключевые слова: неорганическая пирофосфатаза; диссоциация; олигомерные формы.

ВВЕДЕНИЕ

Неорганические пирофосфатазы (КФ 3.6.1.1) гидролизуют пирофосфат до фосфата ($PP_i \rightarrow P_i$). Поскольку PP_i образуется в качестве побочного продукта при биосинтезе важнейших биополимеров, его распад обеспечивает необходимое смещение равновесия этих процессов в сторону синтеза. Все цитозольные пирофосфатазы являются гомоолигомерными белками. Как правило, ферменты из эукариот построены из двух субъединиц, а прокариотические пирофосфатазы – из шести. Для четырех пирофосфатаз известны пространственные структуры, которые дают возможность детального описания контактов между субъединицами [1–4].

Объект настоящего исследования – пирофосфатаза *Escherichia coli* (далее PP-аза) – насчитывает 175 а.о. в субъединице и построена из двух тримеров, которые расположены в параллельных плоскостях и несколько повернуты друг относительно друга. Каждая субъединица в тримере контактирует с двумя соседними субъединицами за счет гидрофобных взаимодействий и водородных связей, в которые вовлечены более двух десятков аминокислотных остатков. В то же время каждая субъединица тримера образует две области контактов с двумя субъединицами второго тримера. Прочность контактов в этих двух областях различна, поскольку в одной из них взаимодействуют только два аминокислотных остатка, а во второй – восемь. Основной вклад в межтримерные контакты вносят две симметричные ион-

ные пары Asp143–His136 и His136–Asp143 (штрихом отмечена субъединица второго тримера). Остальные аминокислоты контактируют за счет водородных связей и гидрофобных взаимодействий [4].

Кинетика гидролиза субстрата гексамерной формой PP-азы не обнаруживает взаимодействия активных центров субъединиц в процессе катализа. Между тем накоплен большой экспериментальный материал, свидетельствующий о взаимном влиянии субъединиц при связывании специфичных лигандов в активных центрах [5–7]. Так, при связывании Mg^{2+} или сульфат-иона возникает асимметрия субъединиц в гексамерной молекуле, а при взаимодействии с фосфатом и эфирами фосфорной кислоты наблюдается реакционная способность лишь половины активных центров.

Для понимания взаимодействия активных центров субъединиц в катализе и выяснения возможных путей передачи информации между субъединицами, приводящих к асимметрии олигомерной молекулы, необходима разработка методов получения различных олигомерных форм фермента и характеристика этих форм, поскольку до сих пор частично охарактеризована лишь тримерная форма PP-азы *E. coli* [8]. В настоящей работе предложены подходы к решению этой проблемы. Получены олигомерные формы PP-азы – тример, димер и мономер – и определены условия и концентрационные пределы существования этих индивидуальных соединений.

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 939-53-62; факс: (095) 939-31-81; эл. почта: vainonen@yahoo.com).

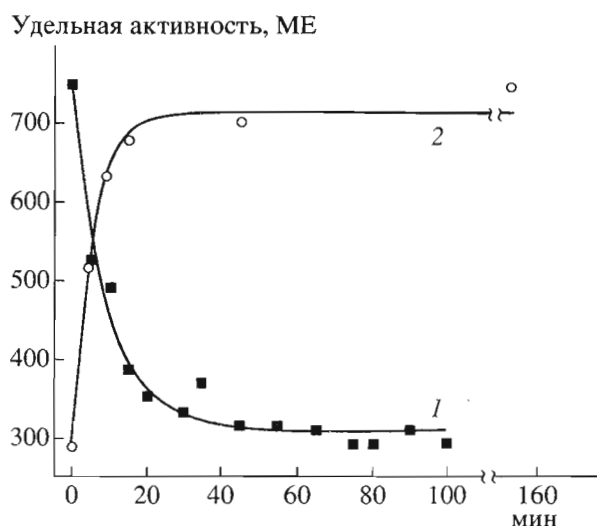
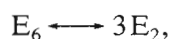
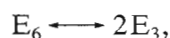


Рис. 1. Диссоциация гексамера РР-азы до тримеров (1) и ассоциация тримеров в гексамер (2). Условия: $[E_6]$ 5 мкМ, рН 5.3 (1); $[E_3]$ 1.19 мкМ, рН 7.5 (2); температура 20°C. Кривые проведены согласно уравнениям скорости реакции первого (1) или второго порядка (2).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как было упомянуто выше, контакты между тримерами в гексамерной молекуле РР-азы обусловлены в основном ионными взаимодействиями, а между мономерами в составе тримеров – гидрофобными. Поэтому для разрушения ионных контактов при получении тримеров мы использовали снижение рН среды, а для разрушения гидрофобных взаимодействий при получении димеров – изменение диэлектрической проницаемости среды при добавлении неполярного растворителя.

Диссоциация гексамерной молекулы РР-азы может приводить к следующим олигомерным формам:



где E – субъединица РР-азы.

Диссоциация фермента сопровождается изменением его активности, поэтому удобными способами слежения за происходящими процессами являются измерение ферментативной активности во времени и определение коэффициентов седиментации исходных и конечных продуктов [9]. Согласно литературным данным, гексамерной форме РР-азы соответствуют коэффициенты седиментации ≥ 6.0 S, тримерной форме – от 3.7 до 4.2 S, димерной форме – от 2.6 до 3.1 S и мономерной – ниже 2.0 S [10].

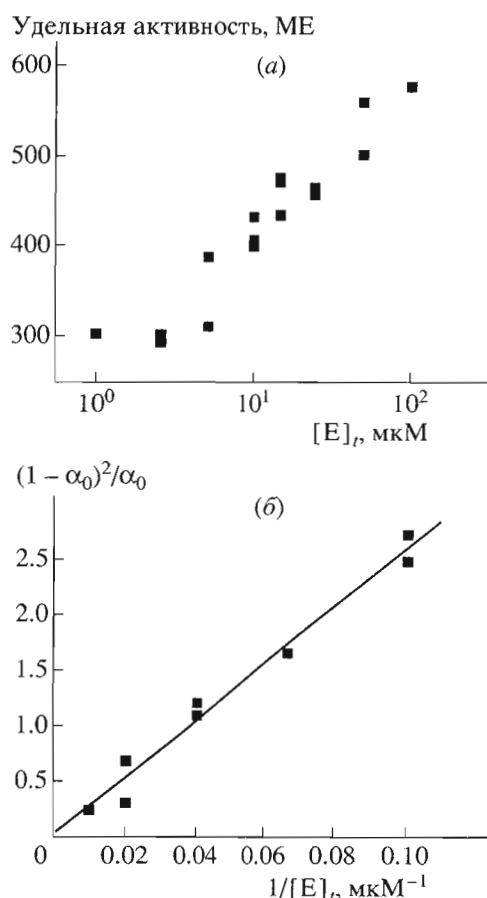


Рис. 2. Зависимость удельной активности РР-азы после 3 ч инкубации при рН 5.3 от концентрации фермента (полулогарифмическая шкала) (а) и определение константы равновесия гексамер–тример (б). $[E]_t$ – общая концентрация фермента в расчете на субъединицу, α_0 – доля гексамерной формы молекулы.

1. Превращение гексамерной формы РР-азы в тримерную

Выдерживание РР-азы в слабокислой среде при 20°C приводит к превращению гексамерной молекулы в тримеры [11]. Из рис. 1 (кривая 1) следует, что инкубация гексамера при рН 5.3 сопровождается быстрым падением активности фермента. Оказалось, что уровень остаточной активности в этих условиях зависит от концентрации белка (рис. 2а). Поскольку диссоциация является реакцией первого порядка, такая зависимость свидетельствует об одновременном протекании обратной реакции ассоциации, т.е. о существовании в кислой среде равновесия гексамер–тример.

Образование тримера и существование равновесия между формами подтверждено определением коэффициента седиментации (таблица, опыт 1), который при низкой концентрации белка (3 мкМ) соответствует тримеру ($s_{20,w} = 3.59 \pm 0.05$ S), но возрастает до 5.6 S при концентрации белка, рав-

Характеристика различных олигомерных форм РР-азы

Номер опыта	Исходная олигомерная форма белка	рН, условия обработки	Условия и коэффициенты седиментации			Константы скорости переходов олигомерных форм		k_{in} , мин ⁻¹	k_{ra} , мин ⁻¹
			t , °С	$[E]_t$, мкМ*	$s_{20, w}, S$ (кол-во субъединиц)	k_d , мин ⁻¹	мин ⁻¹ k_a , мкМ ⁻¹		
1	Гексамер	5.3	20	3	3.59 ± 0.05 (3)	0.102 ± 0.009	0.0059 ± 0.0009	–	–
				20	5.62 ± 0.06 (6)	–	0.314 ± 0.024	–	–
2	Тример	7.5	20	20	6.00 ± 0.12 (6)	–	–	–	–
3	Тример	5.3	4	3	3.22 ± 0.12 (3)	–	–	0.08 ± 0.02	0.095 ± 0.013**
				20	3.52 ± 0.16 (3)	–	–	–	–
4	Гексамер	7.5 20% Pr ⁱ ОН	20	10	2.62 ± 0.23 (2)	0.030 ± 0.002	–	–	–
5	Димер	7.5 2% Pr ⁱ ОН	20	20	6.36 ± 0.09 (6)	–	0.0010 ± 0.0001***	–	–
6	Димер	5.3 20% Pr ⁱ ОН	20	5	агрегаты	0.31 ± 0.03	–	–	–
7	Димер	5.3 2% Pr ⁱ ОН	20	3	3.73 ± 0.15 (3)	0.225 ± 0.001	–	–	–
8	Мономер	5.3 20% Pr ⁱ ОН	20	5	агрегаты	–	–	0.009 ± 0.0009	–

* Концентрация фермента в расчете на субъединицу.

** После перехода от 0 к 20°C.

*** Размерность константы скорости ассоциации – мин⁻¹ мкМ⁻².

ной 20 мкМ. Концентрации белка указаны в расчете на субъединицу.

Из приведенных на рис. 2а данных и результатов скоростной седиментации следует, что при концентрации ниже 5 мкМ белок существует только в виде тримера, удельная активность которого равна 300 МЕ, что составляет около 40% активности гексамера. Эти данные получены после трехчасовой инкубации каждой пробы, когда гарантированно достигается состояние равновесия.

Для расчета констант скоростей переходов всех олигомерных форм необходимо ввести величину α_0 – долю исходной олигомерной формы фермента, рассчитываемую по формуле $\alpha_0 = \frac{A - A^*}{A_0 - A^*}$, где A – наблюдаемая активность в вы-

бранный момент времени t , A^* и A_0 – активности получаемой и исходной олигомерной форм фермента.

Диссоциация гексамера РР-азы до тримеров – реакция первого порядка. Константу скорости диссоциации определяли как тангенс угла наклона прямой, полученной после представления данных в координатах $\ln(1/\alpha_0)$ от t .

Для расчета константы равновесия между гексамером и тримером при рН 5.3 использовали уравнение: $\frac{d\alpha_0}{dt} = \frac{2}{3} k_a [E]_t (1 - \alpha_0)^2 - k_d \alpha_0$ [9], где $[E]_t$ – общая концентрация фермента в расчете на субъединицу, k_a и k_d – константы скорости ассоциации и

диссоциации соответственно. При условии достижения равновесия данное уравнение в координатах

$\frac{(1 - \alpha_0)^2}{\alpha_0}, \frac{1}{[E]_t}$ описывает прямую, тангенс угла

наклона которой равен $\frac{3k_d}{2k_a}$. Представляя данные

в указанных координатах, определяли константу равновесия (рис. 2б). Зная константу скорости диссоциации, рассчитывали константу ассоциации тримеров при рН 5.3. Константы скоростей диссоциации и ассоциации при рН 5.3 приведены в таблице, опыт 1.

Скорость ассоциации тримеров резко возрастает с повышением рН до 7.5. При переносе белка из кислой среды в нейтральную происходит полное восстановление активности белка, т.е. образование вновь гексамерной формы молекулы (рис. 1, кривая 2). Определение коэффициентов седиментации подтверждает этот процесс (таблица, опыт 2). Ассоциация тримеров в гексамер при рН 7.5 описывается уравнением скорости реакции второго порядка. Константу скорости ассоциации определяли как тангенс угла наклона прямой, полученной после представления данных в координатах $1/c$ от t , где c – концентрация тримерной формы в данный момент времени, рассчитанная по формуле $c = (1 - \alpha_0)c_0$, где c_0 – начальная концентрация тримера, равная $\frac{1}{2}[E]_t$.

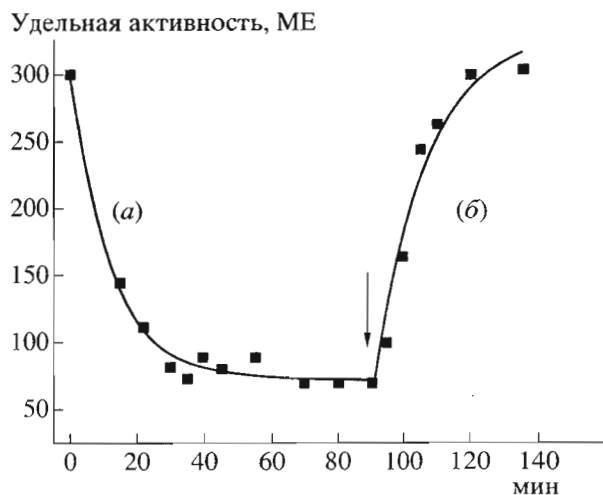


Рис. 3. Инактивация тримера РР-азы при рН 5.3 и 0°C (а) и его реактивация при 20°C (б). Стрелкой показан момент изменения температуры. Ветви кривой проведены согласно уравнению скорости реакции первого порядка.

Значение константы скорости ассоциации приведено в таблице, опыт 2.

Установлено, что характерной особенностью фермента в тримерной форме является его холододовая инактивация (рис. 3). Снижение температуры инкубации тримера, полученного при рН 5.3, от 20 до 0°C ведет к уменьшению ферментативной активности. Процесс инактивации обратим, и активность тримера восстанавливается с повышением температуры (рис. 3). Оба процесса являются мономолекулярными реакциями и не зависят от концентрации белка, что исключает возможное предположение о более глубокой диссоциации при 0°C и реассоциации при повышении температуры до 20°C.

Рассчитаны константы скоростей холодной инактивации и реактивации (таблица, опыт 3). Константу скорости инактивации (k_{in}) определяли как описано выше при определении константы скорости диссоциации гексамера до тримеров. Константу скорости реактивации (k_{ra}) определяли как тангенс угла наклона прямой, полученной после представления данных в координатах $\ln(1/(1 - \alpha_0))$ от t .

Изменение структуры тримера на холоду уменьшает скорость его ассоциации в гексамер. Этот вывод следует из сопоставления данных скоростной седиментации. Если при 20°C, как это было отмечено выше (таблица, опыт 1), тример может быть зарегистрирован только при низкой концентрации белка, то после выдерживания при 0°C и последующей седиментации при 4°C тример не ассоциирует даже при концентрации фермента, равной 20 мкМ (таблица, опыт 3). Коэффициент седиментации инактивированного тримера

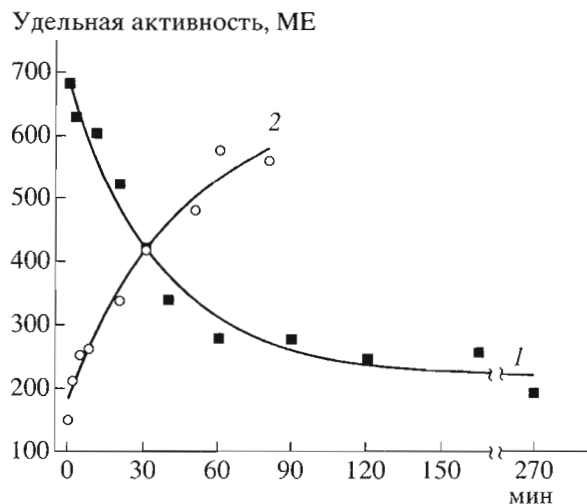


Рис. 4. Диссоциация гексамера РР-азы до димеров (1) и ассоциация димеров в гексамер (2). Условия: $[E_6]$ 10 мкМ, 20% Pr'OH (1); $[E_2]$ 8.33 мкМ, 2% Pr'OH; рН 7.5 (2); температура 20°C. Кривые проведены согласно уравнениям скорости реакции первого (1) или третьего (2) порядка.

при 4°C несколько ниже величины, характерной для тримерной формы, что может быть связано с тем, что структура тримера на холоду становится частично разрыхленной.

2. Превращение гексамерной формы РР-азы в димерную

Для разрушения гидрофобных взаимодействий, участвующих в контактах мономеров в составе тримеров в гексамерной молекуле, изменяли полярность среды. Для этого к раствору РР-азы при рН 7.5 добавляли изопропиловый спирт (Pr'OH) до 20% общего объема. Наблюдаемое изменение активности отражает превращение гексамера в димер (рис. 4, кривая 1). Доказательства образования димера основываются как на определении коэффициента седиментации получаемой формы, который существенно ниже величины, соответствующей тримеру (таблица, опыт 4), так и на результате прямого определения молекулярной массы методом равновесной седиментации. Эта величина оказалась равной 43.7 кДа, в то время как молекулярная масса субъединицы в соответствии с первичной структурой равна 20 кДа.

Удельная активность димера составляет около 25% активности гексамерной формы белка. Диссоциация гексамера РР-азы до димеров является реакцией первого порядка. Константу скорости диссоциации определяли как описано выше при определении константы скорости диссоциации гексамера до тримеров. Константа скорости реакции приведена в таблице, опыт 4.

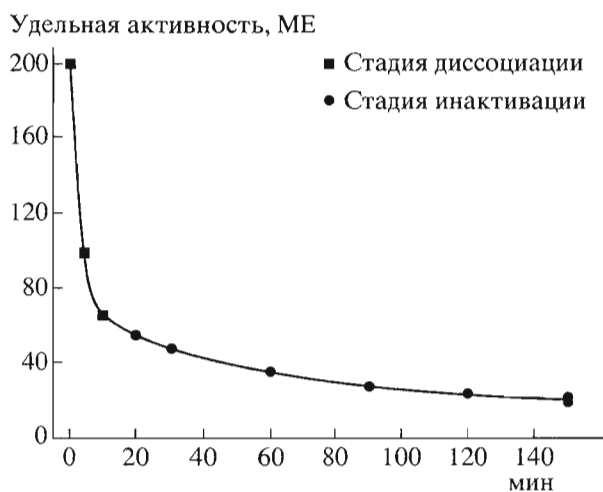


Рис. 5. Диссоциация димера РР-азы до мономера и последующая инактивация фермента. Условия: рН 5.3, 20% РгОН, температура 20°C. Кривые проведены согласно уравнениям скорости реакции первого порядка.

Тримерная и димерная формы фермента отличаются не только активностью, но и свойствами на холоду. При снижении температуры инкубации до 0°C димер не изменяет активности (данные не приведены), а тример, как описано выше, инактивируется.

Ассоциация димеров с восстановлением гексамерной структуры происходит при десятикратном уменьшении содержания изопропанола в реакционной среде (рис. 4, кривая 2). Активность образующегося фермента и коэффициент седиментации соответствуют гексамерной форме. Ассоциация димера является реакцией третьего порядка и, вероятно, включает стадии медленного образования тетрамера и более быстрого его превращения в гексамер. В целом, образование гексамера из димеров при рН 7.5 процесс более медленный, чем ассоциация тримеров. Эти обстоятельства делают димер удобным объектом для последующего изучения его свойств в широком диапазоне концентраций.

Для расчета константы ассоциации димеров в гексамер использовали уравнение скорости реакции третьего порядка. Константу скорости ассоциации димеров при рН 7.5 определяли как тангенс угла наклона прямой, полученной после представления данных в координатах $1/c^2$ от t , где c – концентрация димерной формы РР-азы, рассчитанная по формуле $c = (1 - \alpha_0)c_0$, где c_0 – начальная концентрация димерной формы, равная $\frac{1}{3}$ [Е]. Значение константы приведено в таблице, опыт 5.

Образование димеров из гексамера можно представить двумя различными путями: либо за счет распада всех межсубъединичных контактов в тримерах и сохранения межтримерных контактов (условно такой димер может быть назван “двухэтажным”), либо за счет распада тримера до димера и мономера (образование “одноэтажного” димера). Принципиальным отличием двух типов димеров должно быть их отношение к воздействию слабокислой среды, нарушающей ионные взаимодействия. Поскольку ионные пары сохраняются только в “двухэтажном” димере, дальнейшие превращения полученного димера при рН 5.3 подтверждают его строение.

3. Превращение димерной формы РР-азы в мономерную

Инкубация димера при рН 5.3 в присутствии 20% изопропанола приводит к дальнейшему снижению активности фермента (рис. 5). Полученная картина отражает диссоциацию димера до мономера, медленно инактивирующегося во времени. Скорость инактивации мономеров на порядок ниже скорости диссоциации, что позволяет оценить константы скоростей обоих процессов (таблица, опыты 6 и 8). Скоростная седиментация подтверждает исчезновение димера и появление быстро оседающих агрегатов (таблица, опыт 6). Снижение концентрации изопропанола при инкубации димера при рН 5.3 до 2% приводит к падению ферментативной активности без последующей инактивации. Данные скоростной седиментации показывают, что при концентрации белка 3 мкМ и выше, образуется лишь небольшое количество мономера ($s_{20,w} = 1.54 \pm 0.06$ S), а преимущественной формой является тример (таблица, опыт 7). Наиболее вероятная причина образования тримеров – диссоциация димеров на мономеры, которые быстро ассоциируют. По-видимому, мономер оказывается неустойчивой формой РР-азы, поскольку на его поверхности появляется большое число гидрофобных областей. Для того чтобы зафиксировать чистую мономерную форму белка, была предпринята попытка снижения концентрации раствора фермента и определения молекулярной массы методом гель-фильтрации. Однако и в этом случае белковый пик выходит в пределах молекулярных масс 52–76 кДа, что наиболее близко к тримерной форме РР-азы.

Активность получаемого в данном случае тримера значительно ниже активности тримера, образующегося при обработке нативного гексамера слабой кислотой. Это обстоятельство, вероятно, связано с несовершенством сборки, в результате чего тример получается малоактивным, подобно тому, как это происходит при холодной инактивации. Скорость ассоциации таких тримеров при рН 7.5 значительно ниже, чем скорость ассоци-

ции активных тримеров, что также свидетельствует в пользу этого предположения. Несмотря на то что активность тримеров, получающихся при холодной инактивации активных тримеров и при обработке димеров слабой кислотой, мало различается, эти тримеры могут значительно различаться по структуре.

На основании полученных данных переходы олигомерных форм РР-азы можно описать предлагаемой схемой. Схема включает доказанные переходы гексамерной формы РР-азы к тримеру и димеру, а также предполагаемый переход с изменением структуры тримера при холодной инактивации и возможный путь получения тримеров из димеров через неустойчивую мономерную форму фермента. Толстыми и тонкими линиями показаны субъединицы, входящие в состав разных тримеров. Неполные окружности отражают измененную структуру тримера при низкой температуре. Все переходы происходят при 20°C, за исключением холодной инактивации тримеров, в этом случае температура указана на схеме.

Полученные в настоящей работе результаты требуют сопоставления их с данными литературы. Еще в 1980-х годах было установлено, что диссоциация гексамерной молекулы РР-азы происходит в слабокислой среде или в присутствии изопропанола [11]. Однако структура продуктов не была строго доказана и не были определены кинетические параметры процессов. В 1999 г. описано получение тримера РР-азы [9]. Для диссоциации белок выдерживали в слабокислой среде при 0°C. Полученные результаты нельзя признать корректными, поскольку в настоящей работе мы установили, что в этих условиях идут одновременно два процесса – диссоциация гексамера и холодовая инактивация тримера. В результате конечная активность была приписана активному тримеру, а это в свою очередь исказило все кинетические характеристики. Димер РР-азы был получен в 1999 г. после введения в каждую субъединицу трех-четыре замен аминокислотных остатков, участвующих в контактах как между тримерами, так и внутри тримеров [10]. По мнению авторов, димер образуется из тримера и может быть назван поэтому “одноэтажным” димером. Активность димера Y77F/Q80E/H136Q/H140Q РР-азы составляет доли процента от активности нативной РР-азы. Трудно оценить, является ли столь низкая активность характеристикой димера такого типа или она отражает влияние введенных аминокислотных замен. Полученный из этого димера мономер полностью лишен активности.

Таким образом, в настоящей работе найдены условия получения олигомерных форм РР-азы – тримера, димера и мономера. Показано, что димер и тример обладают высокой удельной активностью, что делает возможным последующее де-

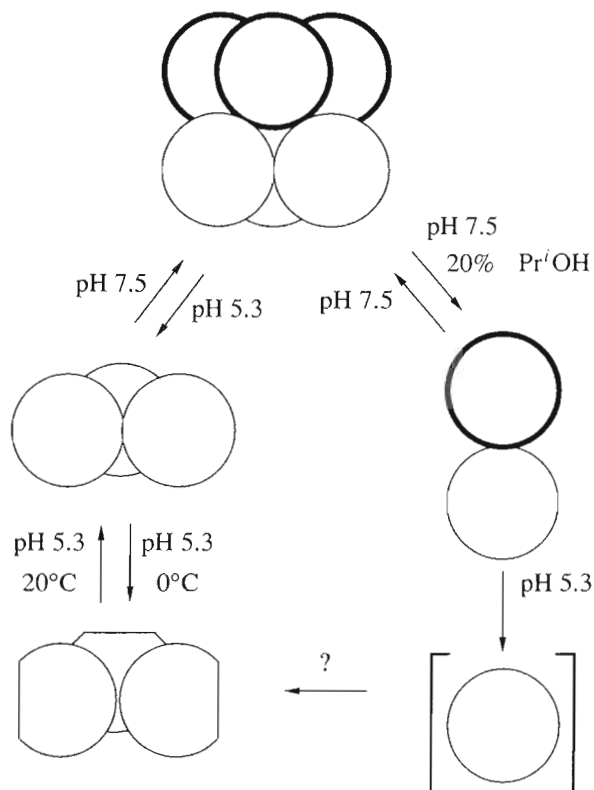


Схема. Переходы олигомерных форм РР-азы *E. coli*.

тальное изучение их каталитических свойств. Следует подчеркнуть, что тример и димер отличаются типом сохраненных контактов, существующих в гексамерной молекуле. Если в тримере субъединицы объединены водородными связями и гидрофобными взаимодействиями, то в димере вычленен один вид взаимодействий – ионные пары, образованные субъединицами. Этот факт позволит при изучении свойств олигомеров выявить как вклад отдельных контактов в свойства нативного фермента, так и пути передачи информации между активными центрами.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Исходные вещества. РР-азу *E. coli* получали как описано ранее [2]. Фермент хранили в виде суспензии в растворе $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, и непосредственно перед использованием обессоливали на колонке с сефадексом G-50 (fine), уравновешенным 50 мМ Трис-НСl, рН 7.5 (далее буфер А). Концентрацию фермента определяли спектрофотометрически, используя величину $A_{280}^{1\%} = 11.8$ [12]. В работе использовали следующие буферные растворы: 0.1 М MES-NaOH, рН 5.3 (Б); 1 М Трис-НСl, рН 7.5 (В).

Определение ферментативной активности. Начальные скорости гидролиза РР_i определяли не-

прерывным методом по образованию фосфата, используя полуавтоматический анализатор фосфата [13]. Реакционная смесь общим объемом 10 мл содержала буфер А, 20 мкМ $MgPP_i$, 1 мМ Mg^{2+} и 0.1–0.5 нМ фермент. Общие концентрации $MgCl_2$ и пирофосфата натрия рассчитывали, исходя из констант диссоциации $MgPP_i$ и Mg_2PP_i , равных 47.7 и 2420 мкМ соответственно [14]. Удельную активность выражали в международных единицах (МЕ). Международная единица активности определяется как количество (в мкмоль) субстрата, расщепляемое 1 мг фермента за 1 мин.

Седиментационный анализ. Скоростную седиментацию осуществляли на аналитической ультрацентрифуге Spinco E при 48000 об/мин, 20 или 4°C и сканировании при 280 нм. Коэффициент седиментации рассчитывали по стандартной методике [15]. Для приведения к стандартным условиям величины коэффициента седиментации для РР-азы в присутствии 20% изопропанола пользовались экспериментально определенным нами коэффициентом пересчета 1.8, представляющим собой отношение величины коэффициента седиментации для химотрипсиногена в буфере А, к той же величине в присутствии 20% изопропанола. Концентрация фермента составляла от 3 до 20 мкМ в расчете на субъединицу.

Эксперименты по седиментационному равновесию проводили при 20000 об/мин, 20°C. Парциальный объем РР-азы *E. coli*, равный 0.73 при 20°C, рассчитывали из аминокислотного состава фермента по методу [16], плотность раствора в присутствии 20% изопропанола принимали равной 0.968 г/см³. Молекулярную массу белка, исходя из данных равновесной седиментации, рассчитывали как описано в работе [17]. Концентрация фермента составляла 20 мкМ в расчете на субъединицу.

Получение тримера и изучение его свойств. Для получения тримера раствор гексамера РР-азы в буфере Б с концентрацией 3–5 мкМ в расчете на субъединицу выдерживали 1 ч при 20°C. Для определения константы равновесия растворы фермента в буфере Б с концентрацией 1–100 мкМ инкубировали 3 ч при 20°C. Ассоциацию тримеров в гексамер проводили при 20°C, добавляя к раствору тримера, полученного при рН 5.3, необходимое для достижения рН 7.5 количество буфера В.

Холодовую инактивацию тримерной формы РР-азы проводили, инкубируя раствор тримера при 0°C. Затем температуру повышали до 20°C и следили за реактивацией тримера.

Получение димера, изучение его свойств и превращение в мономер. Димерную форму РР-азы получали добавлением изопропанола к раствору фермента в буфере А до 20% от общего объема и инкубированием полученного раствора в течение

4 ч при 20°C. Ассоциацию в гексамер проводили, разбавляя 83.3 мкМ раствор димера в 10 раз буфером А при 20°C.

Мономерную форму фермента в присутствии 20% изопропанола получали, добавляя к раствору димера пятикратный избыток буфера Б, содержащего 20% изопропанола, а в отсутствие изопропанола – разбавляя раствор димера буфером Б не менее чем в 10 раз.

Гель-фильтрацию РР-азы проводили на колонке (1.5 × 70 см) со смолой Toyopearl HW-55 (fine), уравновешенной 10 мМ Трис-НСl (рН 7.5) и 100 мМ NaCl. Маркерами служили РР-аза *E. coli* (*M* 120 кДа), РР-аза *S. cerevisiae* (*M* 64 кДа) и цитохром *c* (*M* 12.4 кДа). Калибровку колонки проводили при рН 7.5. Место выхода РР-аз определяли, измеряя активность фракций в оптимальных условиях (50 мМ Трис-НСl, рН 9.0 (для РР-азы *E. coli* [12]) или рН 7.2 (для РР-азы *S. cerevisiae* [18]), 40 мкМ $MgPP_i$, 5 мМ Mg^{2+}). В случае цитохрома *c* место выхода регистрировали спектрофотометрически, измеряя величину оптического поглощения при 280 нм. Исходные концентрации белков составляли 1 мкМ для РР-аз *E. coli* и *S. cerevisiae*, 1.5 мг/мл для цитохрома *c*. Затем смолу уравновешивали 10 мМ MES-NaOH (рН 5.3) и 100 мМ NaCl. Сохранение калибровки колонки при переходе к другому значению рН было показано сохранением места выхода РР-азы *S. cerevisiae* и цитохрома *c*. Димер РР-азы, выдержанный при рН 5.3, наносили на колонку в количестве 1 нмоль, место выхода определяли, измеряя ферментативную активность в собираемых фракциях.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарны сотрудникам отдела седиментации Института физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Н.Н. Магретовой и П.В. Калмыкову за проведение экспериментов по седиментационному анализу, а также коллективу отдела химии белка этого института за интерес к работе и обсуждение полученных результатов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты № 00-04-48315, 00-15-97907 и 01-04-06121 “Молодые ученые, аспиранты, студенты”).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Терзян С.С., Воронова А.А., Смирнова Е.А., Куранова И.П., Некрасов Ю.В., Арутюнян Э.Г., Вайнштейн Б.К., Хене В., Хансен Г. // Биоорганическая химия. 1984. Т. 10. С. 1469–1482.
2. Oganessyan V.Yu., Kurilova S.A., Vorobyeva N.N., Nazarova T.I., Popov A.N., Lebedev A.A., Avayeva S.M., Harutyunyan E.H. // FEBS Lett. 1994. V. 348. P. 301–304.

3. Teplyakov A.V., Obmolova G., Wilson K.S., Ishii K., Kaji H., Samejima T., Kuranova I.P. // *Protein Sci.* 1994. V. 3. P. 1098–1107.
4. Leppanen V.-M., Nummelin H., Hansen T., Lahti R., Schafer G., Goldman A. // *Protein Sci.* 1999. V. 8. P. 1218–1231.
5. Harutyunyan E.H., Oganessyan V.Yu., Oganessyan N.N., Avaeva S.M., Nazarova T.I., Vorobyeva N.N., Kurilova S.A., Huber R., Mather T. // *Biochemistry.* 1997. V. 36. P. 7754–7760.
6. Avaeva S.M., Kurilova S.A., Nazarova T.I., Rodina E.V., Vorobyeva N.N., Sklyankina V.A., Grigorjeva O., Harutyunyan E.H., Oganessyan V.Yu., Wilson K.S., Dauter Z., Huber R., Mather T. // *FEBS Lett.* 1997. V. 410. P. 502–508.
7. Sklyankina V.A., Avaeva S.M. // *Eur. J. Biochem.* 1990. V. 191. P. 195–201.
8. Avaeva S.M., Grigorjeva O.V., Mitkevich V., Sklyankina V.A., Varfolomeev S. // *FEBS Lett.* 1999. V. 464. P. 169–173.
9. Efimova I.S., Salminen A., Pohjanjoki P., Lapinniemi J., Magretova N.N., Cooperman B.S., Goldman A., Lah-ti R., Baykov A.A. // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. P. 3294–3299.
10. Salminen A., Efimova I.S., Parfenyev A.N., Magretova N.N., Mikalahti K., Goldman A., Baykov A.A., Lah-ti R. // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. P. 33898–33904.
11. Борщик И.Б., Склянкина В.А., Аваева С.М. // *Биохимия.* 1986. Т. 51. С. 1607–1611.
12. Josse J. // *J. Biol. Chem.* 1966. V. 241. P. 1938–1947.
13. Baykov A.A., Avaeva S.M. // *Anal. Biochem.* 1981. V. 116. P. 1–4.
14. Курилова С.А., Богданова А.В., Назарова Т.И., Аваева С.М. // *Биоорг. химия.* 1984. Т. 10. С. 1147–1152.
15. Черняк В.Я. *Физико-химические методы в молекулярной биологии.* М.: Изд-во МГУ, 1978.
16. Zamyatnin A.A. // *Progr. Biophys. and Mol. Biol.* 1972. V. 24. P. 107–123.
17. Chernyak V.Ya., Magretova N.N. // *Anal. Biochem.* 1982. V. 123. P. 101–109.
18. Wilson B.K., Fitts S.W., Dunaway-Mariano D. // *Biochemistry* 1981. V. 20. P. 4079–4086.

Hexameric, Trimeric, Dimeric, and Monomeric Forms of Inorganic Pyrophosphatase from *Escherichia coli*

Yu. P. Vainonen[#], S. A. Kurilova^{**}, and S. M. Avaeva^{**}

[#]Phone: +7 (095) 939-5362; fax: +7 (095) 939-3181; e-mail: vainonen@yahoo.com

^{*} Faculty of Chemistry, Moscow State University, Vorob'evy gory, Moscow, 119899 Russia

^{**} Belozerskii Institute of Physicochemical Biology, Moscow State University, Vorob'evy gory, Moscow, 119899 Russia

The conditions were found for obtaining trimeric, dimeric, and monomeric forms of the *Escherichia coli* inorganic pyrophosphatase from its native hexameric form. Interconversions of the oligomers were studied, and rate constants for their dissociation and association were determined. All forms were found to be catalytically active, with the activity decreasing in the order: hexamer–trimer–dimer–monomer. The activity of trimeric and dimeric forms was high enough to study and to compare their catalytic properties. The monomeric form of the enzyme was unstable. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2002, vol. 28, no. 5; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: inorganic pyrophosphatase, dissociation, oligomeric forms