



УДК 577.153.35.3

ОСОБЕННОСТИ ИНГИБИРОВАНИЯ НЕОРГАНИЧЕСКОЙ ПИРОФОСФАТАЗЫ ИЗ ДРОЖЖЕЙ О-ФОСФОЭТАНОЛАМИНОМ*Кузнецов А. В., Склянкина В. А., Аваева С. М.**Межфакультетская проблемная лаборатория молекулярной биологии и биоорганической химии им. А. Н. Белозерского, МГУ*

Изучено взаимодействие неорганической пирофосфатазы из дрожжей с аффинным реагентом — О-фосфоэтаноломином. Реакция имеет двухстадийный характер и приводит к полной и необратимой инактивации фермента. Защитный эффект субстрата, насыщение фермента О-фосфоэтаноломином при малых его концентрациях, полная инактивация при включении 2 моль реагента на 1 моль белка свидетельствуют о модификации группы активного центра фермента. Исследование свойств инактивированной пирофосфатазы показало, что модификация фермента обусловлена образованием ряда продуктов, различающихся по устойчивости связи фермент — ингибитор.

Изучение механизма действия ферментов требует знания белковых групп, вовлеченных в связывание и превращение субстратов, определения особенностей химизма катализируемой реакции и путей регуляции активности фермента, а для ферментов, обладающих четвертичной структурой, — понимания процессов взаимного влияния субъединиц.

Для решения этих вопросов широко применяется метод химической модификации с использованием аффинных реагентов.

Объектом исследования настоящей работы явилась неорганическая пирофосфатаза из дрожжей (КФ 3.6.1.1). Этот фермент в присутствии ионов двухвалентных металлов катализирует гидролиз неорганического пирофосфата, триполифосфата и их моноэфиров [1—3]. В настоящее время полностью установлена первичная структура пирофосфатазы [4] и показано, что фермент является димером, состоящим из двух химически идентичных субъединиц [5]. Известен также ряд аминокислотных остатков, модификация которых инактивирует фермент [6—8]. Однако имеющиеся в литературе данные не позволяют определить роль отдельных функциональных групп в каталитическом процессе. Строго доказано лишь участие аспарагиновой кислоты в ковалентном связывании субстрата [9].

Ранее нами была показана возможность использования для аффинной модификации пирофосфатазы моноэфиров фосфорной кислоты [10]. Так, например, N-хлорацетилфосфоэтанолламин необратимо и специфически инактивирует неорганическую пирофосфатазу, аналогично действию на другие ферменты фосфорного обмена [11]. Было установлено, что неорганическая пирофосфатаза ингибируется также О-фосфоэтаноломином, при взаимодействии с которым выявляется неодинаковое поведение субъединиц фермента [12].

Скорость инактивации фермента под действием О-фосфоэтаноломина зависит от концентраций ингибитора и фермента, а также от pH и ионной

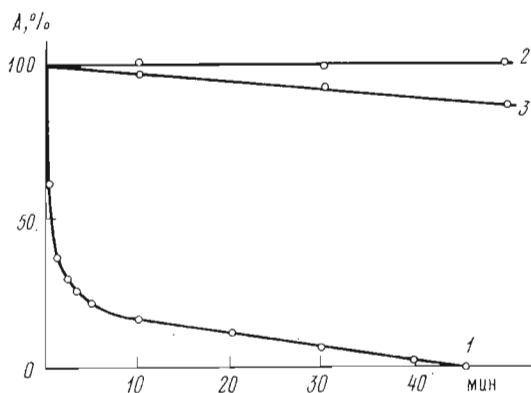


Рис. 1. Инактивация неорганической пирофосфатазы (10^{-7} M) O-фосфоэтанолмином ($7 \cdot 10^{-3}$ M) (1), та же реакция в присутствии 10^{-3} M пирофосфата натрия (2) и $2 \cdot 10^{-3}$ M сульфата магния (3)

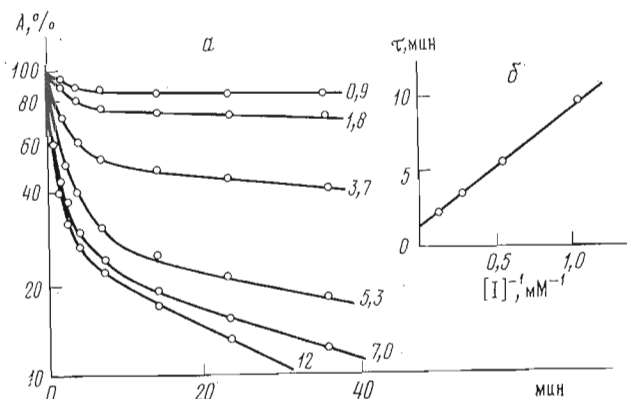


Рис. 2. Инактивация неорганической пирофосфатазы ($2,3 \cdot 10^{-7}$ M) в присутствии различных концентраций O-фосфоэтанолamina: а — кинетика инактивации (концентрация ингибитора (мM) проставлена против соответствующих кривых); б — зависимость полупериода инактивации от концентрации ингибитора

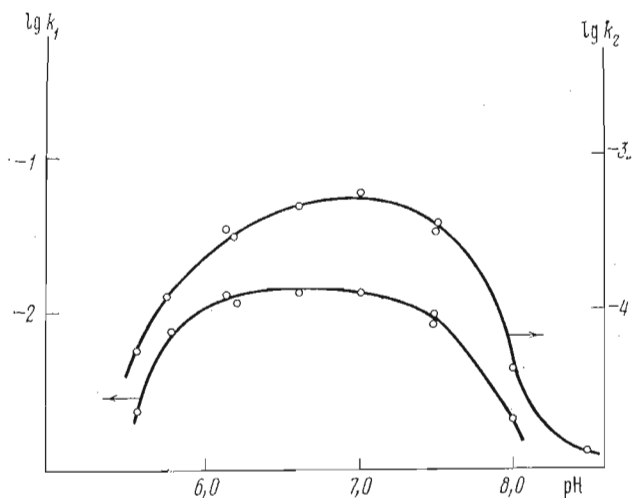
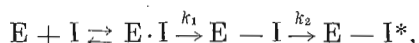


Рис. 3. Зависимость от pH констант скорости быстрой (k_1) и медленной (k_2) стадии инактивации неорганической пирофосфатазы ($1,9 \cdot 10^{-7}$ M) O-фосфоэтанолмином ($7 \cdot 10^{-3}$ M)

силы раствора. Типичная кривая падения ферментативной активности во времени приведена на рис. 1. Видно, что О-фосфоэтаноламин быстро подавляет активность пирофосфатазы и через 40 мин достигается практически полная ее инактивация. При этом четко прослеживаются две стадии реакции, быстрая и медленная (рис. 2а). Характер изменения активности фермента во времени для обеих стадий реакции соответствует кинетике псевдопервого порядка. Константы скорости, рассчитанные по полупериоду инактивации (τ), для первой стадии реакции более чем на порядок выше, чем для второй. Например, при концентрации ингибитора $7 \cdot 10^{-3}$ М и концентрации фермента $2,3 \cdot 10^{-7}$ М (при рН 7,0) они составляют соответственно $1,34 \cdot 10^{-2}$ и $6,2 \cdot 10^{-4}$ с $^{-1}$.

Изучение зависимости скорости первой стадии реакции от концентрации ингибитора при постоянной ионной силе показало, что она не является прямо пропорциональной концентрации О-фосфоэтанолamina. Увеличение концентрации реагента до $7 \cdot 10^{-3}$ М приводит к увеличению константы скорости ингибирования; при дальнейшем росте концентрации реагента константа скорости ингибирования остается постоянной, что свидетельствует о насыщении фермента О-фосфоэтанолamiном. Отсюда следует, что инактивации пирофосфатазы О-фосфоэтанолamiном предшествует образование комплекса, т. е. реакция описывается следующей схемой:



где E — свободный фермент; I — ингибитор, E·I — комплекс; E—I, E—I* — модифицированный фермент.

Характер зависимости (рис. 2б) полупериода инактивации от обратной концентрации ингибитора согласуется с уравнением

$$\tau = \frac{1}{[I]} (TK_i) + T \quad [13],$$

где T — минимальный полупериод инактивации. Графически рассчитанная константа связывания реагента (K_i) составляет 4,5 мМ.

Сравнительно высокое сродство О-фосфоэтанолamina к пирофосфатазе, а также быстрая инактивация фермента под действием О-фосфоэтанолamina обусловлены наличием в молекуле ингибитора остатка фосфорной кислоты. Действительно, в специально поставленных опытах было показано, что инкубация пирофосфатазы с 10^{-2} М этаноламином в течение 4 ч не вызывает уменьшения ферментативной активности.

Существенно, что субстрат и ионы магния защищают фермент от инактивации. При инкубации с О-фосфоэтанолamiном в присутствии 10^{-3} М пирофосфата натрия активность сохраняется полностью, а в присутствии $2 \cdot 10^{-3}$ М сульфата магния уменьшается за 2 ч лишь на 20% (рис. 1). Следует также отметить, что скорость инактивации значительно уменьшается с ростом концентрации фермента и ионной силы раствора. Так, например, ингибирование фермента концентрации 10 мкг/мл характеризуется константой скорости в 20 раз большей, чем при ингибировании фермента концентрации 80 мкг/мл. А при концентрации более 200 мкг/мл пирофосфатаза полностью устойчива к действию О-фосфоэтанолamina.

Скорость инактивации неорганической пирофосфатазы на обеих стадиях реакции зависит от рН, причем как для первой, так и для второй стадии кривая этой зависимости имеет колоколообразную форму с максимумом при рН около 7,0 (рис. 3). На основании полученных зависимостей были оценены значения рК групп, влияющих на взаимодействие пирофосфатазы с О-фосфоэтанолamiном. Протонирование группы фермента с рК ~ 7,5 приводит к резкому увеличению скорости инактивации. Последняя увеличивается также при депротонировании группы с рК ~ 6,1. Пони-

мание природы этих групп в механизме взаимодействия пирофосфатазы с О-фосфоэтанололамином пока представляется трудным.

Причиной инактивации неорганической пирофосфатазы является ковалентное связывание О-фосфоэтанололамина. Молекула полностью неактивного фермента содержит $\sim 2,3$ молекулы ингибитора. Поскольку пирофосфатаза представляет собой димер, состоящий из двух химически идентичных субъединиц, можно думать, что связывание каждой субъединицей фермента одной молекулы реагента вызывает полную утрату каталитических свойств.

Из приведенных выше данных вытекает, что О-фосфоэтанололамин — специфический ингибитор неорганической пирофосфатазы из дрожжей. Полученные результаты по защитному эффекту субстратом, насыщению фермента О-фосфоэтанололамином при низких его концентрациях, полной инактивации фермента при включении 2 моль реагента на 1 моль белка свидетельствуют, что реакция пирофосфатазы с О-фосфоэтанололамином направлена по активному центру фермента.

Детальное исследование кинетики модификации и устойчивости ингибированного фермента показало, что модификация является сложным многостадийным процессом, протекающим во времени и обусловленным образованием ряда продуктов, которые различаются по устойчивости ковалентной связи фермент — ингибитор.

В начале реакции обработка пирофосфатазы О-фосфоэтанололамином приводит к быстрому образованию модифицированного белка, находящегося в равновесии с комплексом фермент — ингибитор. Регенерация активного фермента происходит при разбавлении инкубационной смеси или при отделении избытка ингибитора гель-фильтрацией. Для обнаружения связанного с белком ингибитора необходима денатурация фермента, что достигается добавлением додецилсульфата натрия. При этом поведение модифицированной пирофосфатазы подобно поведению фосфорилированного фермента, образующегося в реакции с субстратом или неорганическим фосфатом [9].

Одновременно с этим процессом наблюдается образование другого типа производного фермента, также содержащего ковалентно связанный реагент. Этот модифицированный белок устойчив в отсутствие избытка О-фосфоэтанололамина и может быть выделен гель-фильтрацией без добавления додецилсульфата натрия. Так, пирофосфатаза, обработанная 10^{-2} М О-фосфоэтанололамином в течение 15 с и затем выдержанная с додецилсульфатом натрия, содержит 1 моль реагента на 1 моль белка. Белок, полученный в аналогичных условиях, но выделенный без добавления денатурирующего агента, содержит только 0,5 моль ингибитора на 1 моль фермента. Через 4 мин реакции эти величины составляют соответственно 2,2 и 1,5.

В модифицированном ферменте, выделенном без денатурации, связь с ингибитором может быть разрушена обработкой субстратом или нуклеофильным агентом, например имидазолом. Этот процесс протекает во времени и приводит к восстановлению активности фермента.

Скорость реактивации, как и скорость инактивации, зависит от многих факторов. Она возрастает с увеличением концентрации нуклеофильного агента, субстрата и белка, а также ионной силы раствора. Зависимость скорости реактивации от концентрации пирофосфата обнаруживает насыщение при концентрациях пирофосфата больше 10^{-3} М, что, возможно, связано с действием пирофосфата по месту присоединения О-фосфоэтанололамина. Увеличение скорости реактивации вызывается также увеличением рН от 6,5 до 8,5.

Таким образом, при взаимодействии неорганической пирофосфатазы с О-фосфоэтанололамином в начальный момент времени образуется модифицированный фермент, в котором ингибитор связан двумя типами связи. Одна устойчива только в присутствии высоких концентраций ингибитора

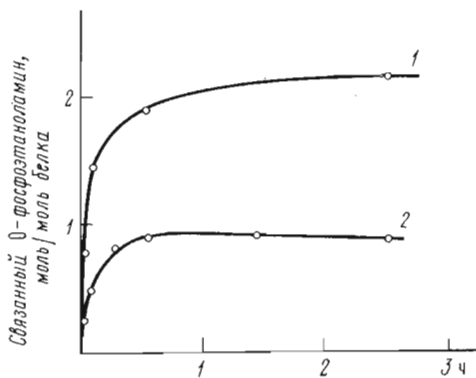


Рис. 4

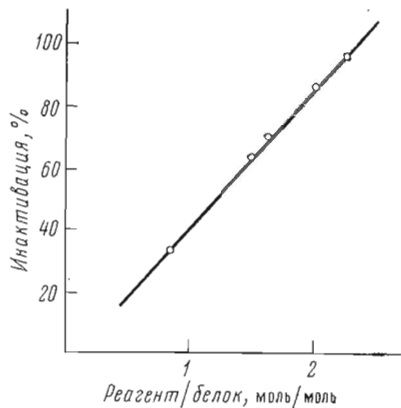


Рис. 5

Рис. 4. Количество связанного ингибитора в модифицированной пирофосфатазе (1) и после обработки ее имидазолом (1 ч, 30° С) (2), $[E] 5,4 \cdot 10^{-7} M$, $[I] 10^{-2} M$

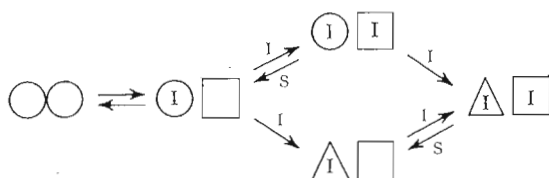
Рис. 5. Зависимость степени инактивации пирофосфатазы ($5,4 \cdot 10^{-7} M$) O-фосфотриамидом ($10^{-2} M$) от количества связанного ингибитора

($10^{-2} M$), вторая сохраняется и при освобождении от последнего. Существенно, что вторая связь тоже весьма лабильна и фермент можно регенерировать с восстановлением активности. Следует также отметить, что содержащиеся в белке ингибитора, присоединенного по первому типу, характеризуется колоколообразной зависимостью от времени инкубации. В первые минуты оно быстро увеличивается, достигая 1 моль в расчете на 1 моль белка, а затем медленно уменьшается до нуля. Например, при взаимодействии $5 \cdot 10^{-7} M$ пирофосфатазы с $10^{-2} M$ O-фосфотриамидом его количество в расчете на 1 моль белка через 15 с, 4, 30 и 120 мин составляет соответственно 0,5; 0,7; 0,2; 0 моль.

Более медленно протекает еще одна реакция, приводящая к образованию прочной связи между пирофосфатазой и ингибитором. Содержание соответствующего производного фермента можно определить после отделения избытка реагента и последующей обработки модифицированной пирофосфатазы субстратом или имидазолом. Из графика, приведенного на рис. 4, видно, что образование модифицированного фермента с прочно связанным ингибитором развивается во времени и количество реагента, связанного такой связью, достигает 1 моль на 1 моль белка.

O-Фосфотриамин является бифункциональным соединением, содержащим две реакционноспособные группы, фосфатную и аминную. Известно, что в активный центр неорганической пирофосфатазы входит активированная карбоксильная группа [14]. Это позволяет предположить, что в модифицированной O-фосфотриамидом пирофосфатазе лабильная связь с реагентом является ацилфосфатной, а прочная — амидной. Нам ранее было высказано предположение, что образование различных по природе связей реализуется в различных субъединицах фермента [12]. Об этом свидетельствуют данные, приведенные на рис. 4. Видно, что и лабильная, и прочная формы модифицированного фермента образуются максимум на 50%. При этом наблюдается полная корреляция между степенью модификации и глубиной инактивации пирофосфатазы (рис. 5). Из сравнения результатов, приведенных на рис. 4 и 5, следует, что полностью неактивный фермент содержит 2 моль ингибитора, из которых 1 моль, по-видимому, связан ацилфосфатной связью, а второй — амидной.

На основании полученных данных можно предложить следующую вероятную схему реакции неорганической пирофосфатазы с O-фосфотриамидом:



где \bigcirc - нативная субъединица,
 \bigcirc I, \square I - фосфорилированные субъединицы,
 \triangle I - аминированная субъединица

На первом этапе образуется комплекс фермент — ингибитор за счет связывания фосфатной группы молекулы ингибитора в сорбционной области пирофосфатазы. Затем, в соответствии со схемой, вероятно, происходит фосфорилирование одной субъединицы фермента с образованием высоколабильной ацилфосфатной связи. Это сопровождается конформационными перестройками белка. Модификация второй субъединицы происходит более медленно, а образующаяся ацилфосфатная связь, устойчивая в отсутствие избытка реагента, может быть разрушена обработкой субстратом или имидазолом. Далее происходит взаимодействие субъединицы с высоколабильной ацилфосфатной связью с аминогруппой *O*-фосфоэтанолamina, сопровождающееся разрывом ацилфосфатной связи и образованием прочной амидной связи. Этот процесс может происходить параллельно образованию фосфорилированной субъединицы с устойчивой ацилфосфатной связью. Таким образом, молекула полностью инактивированного фермента, по-видимому, состоит из двух модифицированных субъединиц, гетерогенных по типу связи с ингибитором: одна субъединица содержит ацилфосфатную связь, вторая — амидную.

Экспериментальная часть

Неорганическую пирофосфатазу (M 65 000) выделяли из маточных пекарских дрожжей по видоизмененной методике Купермана [15]. Удельная активность составила 800 МЕ/мг.

В работе использовали ПИПЭС — пиперазин-бисэтансульфонат (Sigma, Англия), этаноламин (BDH, Chemicals, Англия), сефадекс G-50, средний (Serva, ФРГ), имидазол и трис (Reanal, Венгрия).

O-Фосфоэтаноламин синтезировали по методике [16].

Ферментативную активность определяли по количеству ортофосфата, образующемуся в течение 2—5 мин в 0,1 М трис-НСl-буфере, рН 7,25, содержащем $1,7 \cdot 10^{-3}$ М сульфат магния и $1,7 \cdot 10^{-3}$ М пирофосфат натрия. Реакцию останавливали добавлением 4 н. серной кислоты. Количество образующегося ортофосфата определяли на полуавтоматическом анализаторе по методу [17].

Для определения количества ингибитора, связанного с пирофосфатазой, препараты модифицированного фермента лиофильно высушивали, обессоливали на колонке с сефадексом G-50, затем минерализовали в смеси 60% хлорной кислоты с 10 н. серной кислотой в течение 30 мин при 190° С и определяли количество неорганического фосфата [18].

Инактивация неорганической пирофосфатазы под действием O-фосфоэтанолamina. Фермент ($5 \cdot 10^{-3}$ — 1,5 мг) инкубировали в 1—30 мл буферного раствора (рН 5,5—8,5), содержащего $7 \cdot 10^{-5}$ — $5 \cdot 10^{-2}$ М *O*-фосфоэтаноламин, при 30° С. Через определенные промежутки времени (0—300 мин) отбирали алиquotы для определения активности фермента. В отдельных опытах реакцию проводили в присутствии 10^{-3} М пирофосфата натрия и $2 \cdot 10^{-3}$ М сульфата магния.

Расчет констант скорости реакции и константы ингибирования. На основании полученных данных строили графики зависимости ферментативной активности от времени в логарифмических координатах. Суммарную константу скорости рассчитывали по формуле $k_1 + k_2 = 0,693/\tau'$, где τ' — полупериод инактивации для первой стадии. Константу скорости второй стадии рассчитывали по формуле $k_2 = 0,693/\tau''$ (τ'' — полупериод инактивации для второй стадии). Для нахождения константы ингибирования (K_i) строили график зависимости полупериода инактивации (τ) от обратной концентрации реагента.

Модификация неорганической пирофосфатазы О-фосфоэтаноломином. Фермент (0,5 мг) инкубировали с 14 мл 10^{-2} М раствора О-фосфоэтанол-амина в 0,05 М буфере ПИПЭС — NaOH, pH 7,1, в течение 0,5—90 мин при 30° С. Раствор лиофильно высушивали, растворяли в 2 мл 0,05% раствора додецилсульфата натрия, обессоливали на колонке с сефадексом G-50, уравновешенном 0,05% раствором додецилсульфата натрия, и определяли количество реагента, включившегося в белок.

Параллельно определяли количество связанного реагента в пирофосфатазе, подвергнутой зналогичной обработке, исключая добавление раствора додецилсульфата натрия.

Реакция модифицированной пирофосфатазы с имидазолом. Фермент (0,5 мг) инкубировали в 14 мл $7 \cdot 10^{-3}$ М раствора О-фосфоэтанол-амина в 0,1 М трис-HCl-буфере (pH 7,1) при 25° С. Через определенные промежутки времени (0—90 мин) отбирали пробы, разбавляли их в 1000 раз 0,1 М имидазол-HCl-буфером (pH 7,25), выдерживали в течение 0—60 мин при 25° С и определяли ферментативную активность. Кроме того, фермент (0,5 мг) инкубировали с 14 мл 10^{-2} М раствора О-фосфоэтанол-амина в 0,05 М буфере ПИПЭС — NaOH, pH 7,1, в течение 0,5—90 мин при 30° С. Раствор обессоливали на колонке с сефадексом G-50, добавляли 0,2 мл 0,2 М раствора имидазол — HCl, pH 8,5, выдерживали 1 ч при 30° С, еще раз обессоливали и определяли количество реагента, связанного с белком.

Реакция модифицированной пирофосфатазы с неорганическим пирофосфатом. Фермент ($5 \cdot 10^{-3}$ — $1,4 \cdot 10^{-2}$ мг) инкубировали с 1 мл 10^{-2} М раствора О-фосфоэтанол-амина в 0,05 М буфере ПИПЭС — NaOH, pH 7,1, в течение 5—60 мин при 25° С. К реакционной смеси добавляли 0,005—0,1 мл 10^{-2} М раствора пирофосфата натрия и через определенные промежутки времени (0—60 мин) определяли ферментативную активность.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kunitz M. (1962) J. Gen. Physiol., 45, 31—46.
2. Shlesinger M. J., Coon M. (1960) Biochim. et biophys. acta, 41, 30—36.
3. Höhne W., Heitmann P., Rapoport T. (1974) Acta biol. et med. german., 35, 128—136.
4. Cohen S. A., Sterner R., Keim P. S., Heinrikson R. L. (1978) J. Biol. Chem., 253, 889—898.
5. Heinrikson R. L., Sterner R., Noyes C., Cooperman B. S., Bruckmann R. H. (1973) J. Biol. Chem., 248, 2521—2528.
6. Склянкина В. А., Медведева И. В., Аваева С. М. (1973) Докл. АН СССР, 211, 494—496.
7. Cooperman B. S., Chiu N. Y. (1973) Biochemistry, 12, 1676—1682.
8. Yana Y., Negi T., Irie M. (1973) J. Biochem. (Tokyo), 74, 67—76.
9. Байков А. А., Бакuleva N. P., Nazarova T. I., Awaeva S. M. (1977) Biochim. et biophys. acta, 481, 184—194.
10. Аваева С. М., Дяков М. М., Кузнецов А. В., Склянкина В. А. (1977) Биоорган. химия, 3, 943—948.
11. Hartman F. C., Norton I. L. (1976) J. Biol. Chem., 251, 4565—4569.
12. Кузнецов А. В., Склянкина В. А., Аваева С. М. (1978) Биоорган. химия, 4, 984—986.
13. Fahrney D. E., Gold A. M. (1963) J. Amer. Chem. Soc., 85, 997—1000.
14. Аваева С. М., Бакuleva N. P., Baratova L. A., Nazarova T. I., Fink N. Y. (1977) Biochim. et biophys. acta, 482, 173—184.
15. Cooperman B. S., Chiu N. Y., Bruckmann R. H., Bunick G. J., McKenna G. P. (1973) Biochemistry, 12, 1665—1669.

16. Кузнецов А. В., Аваева С. М., Байков А. А., Склянкина В. А. (1977) Биорг. химия, 3, 950—956.
17. Байков А. А., Аваева С. М. (1973) Eur. J. Biochem., 32, 136—142.
18. Hess H. H., Derr J. E. (1975) Anal. Biochem., 63, 607—613.

Поступила в редакцию
26.II.1979

SOME FEATURES OF INHIBITION OF INORGANIC YEAST PYROPHOSPHATASE BY O-PHOSPHOETHANOLAMINE

KUZNETSOV A. V., SKLYANKINA V. A., AVAIEVA S. M.

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

Interaction between inorganic yeast pyrophosphatase and the affinity reagent, O-phosphoethanolamine, has been studied. This two-step reaction results in complete and irreversible inactivation of the enzyme. The protective effect of the substrate, enzyme saturation at low concentrations of O-phosphoethanolamine, and complete inactivation upon introduction of 2 moles of the reagent per mole of protein are indicative of modification of some group on the enzyme active site. The study of the properties of the inactivated pyrophosphatase shows that modification is due to formation a number of products differing in stability of the enzyme-inhibitor bond.
