



УДК 577.152.361*1'134:577.112.4

НЕОБРАТИМОЕ СПЕЦИФИЧЕСКОЕ ИНГИБИРОВАНИЕ НЕОРГАНИЧЕСКОЙ ПИРОФОСФАТАЗЫ *E. coli* АМИНАМИ

© 1997 г. А. В. Буробин, М. В. Ломонова, В. А. Склянкина, С. М. Аваева[#]

Химический факультет и Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119899, Москва, Воробьевы горы

Поступила в редакцию 14.05.96 г.

Показана необычно высокая реакционная способность карбоксильных групп активного центра неорганической пирофосфатазы *E. coli* в отношении аминов. Эфиры аминокислот и другие амины являются специфическими необратимыми ингибиторами фермента. Реакция включает в себя образование комплекса фермент–ингибитор с последующей химической модификацией остатков дикарбоновых аминокислот. Предполагается, что связывание положительно заряженного ингибитора осуществляется в центре присоединения катионов-активаторов.

Ключевые слова: неорганическая пирофосфатаза, амины, активный центр, химическая модификация.

Неорганические пирофосфатазы (КФ 3.6.1.1) катализируют гидролиз и синтез фосфоангидридной связи, поддерживая таким образом концентрацию неорганического пирофосфата (PP_i) в клетке на необходимом уровне. К настоящему времени известны первичные структуры растворимых пирофосфатаз из 10 организмов [1–3]. Четвертичные структуры пирофосфатаз из различных источников различаются по количеству субъединиц в составе олигомера. Так, если пирофосфатаза из *Saccharomyces cerevisiae* образует димер массой 64 кДа, то фермент из *Escherichia coli* массой 120 кДа состоит из шести химически идентичных субъединиц [4, 5]. Во всех известных пирофосфатазах 21 аминокислотный остаток консервативен, из них 15 имеют в боковых радикалах функциональную группу. По данным рентгеноструктурного анализа, выполненного для пирофосфатаз из *S. cerevisiae* [6], *E. coli* [7] и *Thermos thermophilus* [3] (с разрешением 3.0, 2.2 и 2.0 Å соответственно), все они обращены в полость активного центра. Существенно, что половина этих аминокислотных остатков – остатки дикарбоновых аминокислот Asp и Glu. Все растворимые пирофосфатазы проявляют активность в присутствии ионов двухвалентных металлов, причем максимум активности достигается в случае Mg^{2+} . Известно, что ионы магния обладают высокой специфичностью связывания по отношению к карбоксильным группам Asp и Glu. Очевидно, что остатки дикарбоновых аминокис-

лот, входящих в состав активного центра пирофосфатазы, могут быть потенциальными лигандами ионов магния. Функциональная важность остатков дикарбоновых аминокислот была подтверждена результатами химической модификации [8–10] и сайт-направленного мутагенеза [11, 12].

В настоящей работе продемонстрирована необычная реакционная способность карбоксильных групп фермента по отношению к аминам и предложен новый класс необратимых специфических ингибиторов, позволяющих охарактеризовать особенности состояния остатков дикарбоновых аминокислот в активном центре неорганической пирофосфатазы из *E. coli* (далее – пирофосфатаза).

Взаимодействие пирофосфатазы с аминами приводит к инактивации фермента

Изучение взаимодействия пирофосфатазы с аминами показало, что фермент эффективно ингибируется метиламином, 2-аминопиридином, эфирами таких аминокислот, как глицин, лейцин, фенилаланин. Реакцию с аминами проводили, инкубируя фермент с ингибитором при pH 6.8 и измеряя ферментативную активность через определенные промежутки времени. Полученные результаты представляли графически в виде зависимости $\lg((A_t - A_T)/(A_0 - A_T))$ от времени, где A_0 , A_t , A_T – активность фермента, исходная, в данный момент времени и при максимальной глубине инактивации. Наблюдаемую константу скорости (k^*) рассчитывали как тангенс угла наклона соответствующего участка прямой. Представление

Сокращения: PP_i – неорганический пирофосфат, MOPSO – 3-морфолин-2-гидроксипропансульфонокислота.

[#] Автор для переписки.

кинетической кривой инактивации фермента с каждым из исследованных ингибиторов в полулогарифмических координатах (рис. 1) позволяет выделить две стадии реакции, подчиняющиеся кинетике псевдопервого порядка. Наблюдаемые константы скоростей для них различаются более чем на порядок. Так, в случае 1 мМ этилового эфира лейцина $k_1^* = 0.2 \text{ мин}^{-1}$ ("быстрая" стадия), а $k_2^* = 0.01 \text{ мин}^{-1}$ ("медленная" стадия). Данный факт можно объяснить двояко: либо в реакцию с аминами вступают различные аминокислотные остатки фермента, либо при взаимодействии с аминами тримеры гексамерной пирофосфатазы проявляют неидентичное поведение – инактивация одного тримера сопровождается уменьшением скорости реакции со вторым (отрицательная кооперативность пирофосфатазы *E. coli* по отношению к ингибиторам была ранее продемонстрирована на примере реакции с моноэфирами фосфорной кислоты [13]). Выбор между этими вариантами может быть сделан после локализации модифицированных остатков аминокислот в первичной структуре пирофосфатазы.

Необратимый характер ингибирования пирофосфатазы аминами

Ингибирование пирофосфатазы аминами необратимо. Это было доказано рядом независимых экспериментов. Во-первых, фермент, инактивированный этиловым эфиром лейцина до 50% остаточной активности, разбавляли в 250 раз буфером, имеющим рН 6.8 или 9.0 (причем как в присутствии NaCl, так и без добавления последнего). Во-вторых, пирофосфатазу, инактивированную этиловым эфиром [¹⁴C]глицина на 35%, освобождали от избытка низкомолекулярных соединений гель-фильтрацией или диализом. Во всех описанных случаях инактивированный фермент не восстанавливал активности, что свидетельствует о ковалентном присоединении ингибитора к белку.

Модифицированная этиловым эфиром [¹⁴C]глицина пирофосфатаза содержала не более 1 моль радиоактивного ингибитора на 1 моль субъединиц белка. После денатурации инактивированного белка в 5 М гуанидинхлориде, последующего диализа и протеолитического расщепления трипсином в пептидном материале обнаруживалась радиоактивная метка в количествах, соответствующих степени инактивации модифицированного фермента (данные не приведены).

Химической модификации пирофосфатазы предшествует образование комплекса

Зависимость наблюдаемой константы скорости инактивации пирофосфатазы от концентрации этилового эфира лейцина (рис. 2а) имеет ги-

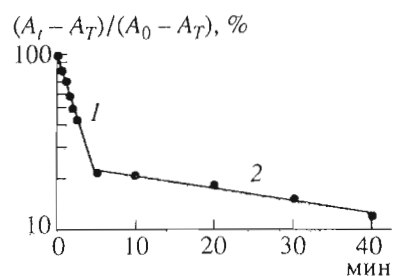


Рис. 1. Инактивация пирофосфатазы на примере действия этилового эфира лейцина (1 мМ). 1 и 2 – "быстрая" и "медленная" стадии реакции соответственно. Условия см. в "Экспер. части".

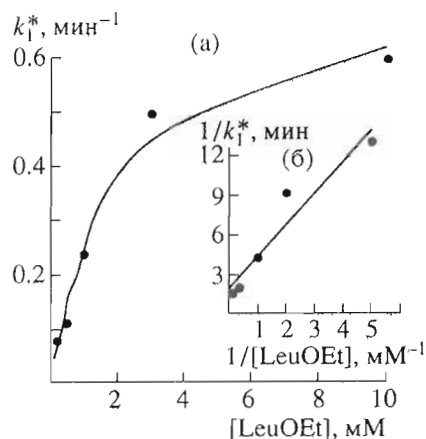


Рис. 2. Зависимость наблюдаемой константы скорости инактивации пирофосфатазы (для "быстрой" стадии) от концентрации этилового эфира лейцина в прямых (а) и в двойных обратных координатах (б). Условия см. в "Экспер. части".

перболический характер. Это свидетельствует о протекании реакции по схеме



Отсюда был сделан вывод, что химической модификации фермента аминами предшествует образование комплекса фермент-ингибитор. Линеаризация полученной зависимости в двойных обратных координатах (рис. 2б) позволила определить основные параметры реакции – константу ингибирования (K_1) и константу скорости химической модификации (k). В условиях проведения эксперимента для "быстрой" стадии $K_{11} = 0.96 \pm 0.56 \text{ мМ}$, а $k_1 = 0.62 \pm 0.28 \text{ мин}^{-1}$. Зависимости для "медленной" стадии имели такой же характер, и рассчитанные параметры составили $K_{12} = 1.13 \pm 0.37 \text{ мМ}$ и $k_2 = 0.025 \pm 0.005 \text{ мин}^{-1}$. Видно, что обе стадии реакции, различаясь на порядок по константам скоростей, имеют практически равные по значениям константы связывания ингибитора. Можно предположить, что ингибитор, образуя комплекс с белком, связывается с одним участком фермента,

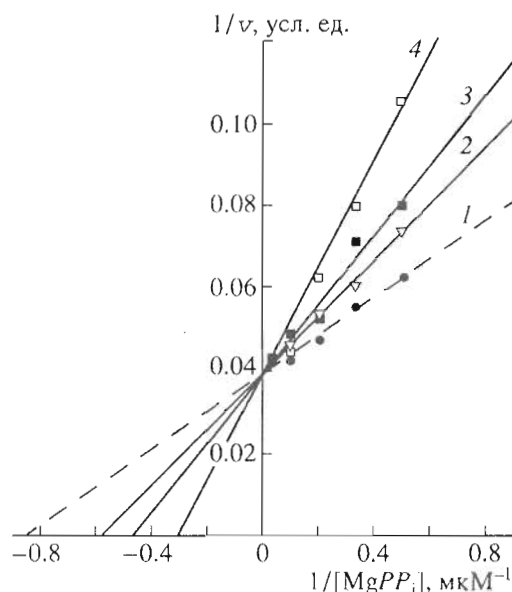


Рис. 3. Зависимость начальной скорости ферментативного гидролиза $MgPP_i$ от концентрации субстрата в присутствии этилового эфира лейцина в координатах Лайнуивера–Берка. $[LeuOEt]$, мМ: 0 (1), 4 (2), 8 (3) и 10 (4).

а затем с разными скоростями образует ковалентную связь с различными аминокислотными остатками пирофосфатазы.

Реакция с аминами идет по активному центру пирофосфатазы

Опыты по инактивации пирофосфатазы аминами в присутствии $CaPP_i$ показали, что негидролизуемый аналог субстрата полностью защищает фермент от инактивации, исключая, по-видимому, доступ ингибитора в активный центр. О взаимодействии аминов с активным центром пирофосфатазы свидетельствует также результат исследования кинетики гидролиза $MgPP_i$ в присутствии различных концентраций этилового эфира лейцина (рис. 3). Из представленных данных видно, что этиловый эфир лейцина не изменяет максимальную скорость гидролиза, оказывая влияние на связывание субстрата, т.е. проявляет свойства конкурентного ингибитора. Константу ингибирования определяли по формуле

$$K_i = [LeuOEt]/(K_p/K_m - 1),$$

где $1/K_p$ и $1/K_m$ — точки пересечения прямых с осью абсцисс в присутствии и в отсутствие ингибитора соответственно. В условиях проведения кинетических измерений (рН 6.8, 25°C, концентрация свободного Mg^{2+} 5 мМ) найденная константа ингибирования составила 8 мМ. Таким образом, полученные результаты позволили предположить, что в ходе реакции пирофосфатазы с аминами проис-

ходит связывание реагента по активному центру фермента.

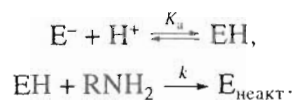
Поскольку единственным способом ковалентного присоединения аминов к белку является образование амидной связи с карбоксильными группами остатков Glu и Asp, можно полагать, что блокирование именно этих групп и приводит к потере каталитической активности пирофосфатазы под действием аминов.

Сродство ингибитора к ферменту определяется строением амина

Интересным оказалось сравнение действия на пирофосфатазу этилового эфира лейцина и метилового эфира глицина. Имея одинаковую основность ($pK_a \sim 7.7$), они значительно (более чем на порядок) различаются по величине K_i (~1 мМ для эфира лейцина и ~30 мМ для эфира глицина при рН 6.8), проявляя таким образом различное сродство к ферменту. Можно думать, что более эффективное связывание эфира лейцина с пирофосфатазой обусловлено возникновением дополнительных взаимодействий между углеводородным радикалом ингибитора и гидрофобными аминокислотными остатками фермента, находящимися вблизи взаимодействующих с амином остатков дикарбоновых аминокислот.

Аномально высокие значения pK_a реагирующих карбоксильных групп пирофосфатазы

Для характеристики карбоксильных групп пирофосфатазы, образующих ковалентную связь с ингибитором, была исследована кинетика инактивации фермента под действием этилового эфира лейцина в интервале рН 6.5–9.0 (рис. 4). Обнаруженные тенденции к снижению скорости инактивации с увеличением рН говорит о том, что химической модификации подвергается протонированная карбоксильная группа, т.е. активной формой пирофосфатазы, реагирующей с амином, является ее кислотная форма. Исходя из этого схему реакции можно представить следующими уравнениями:



В этом случае наблюдаемая константа скорости инактивации может быть представлена уравнением [14]

$$k^* = k - k^* \cdot K_a/[H^+]$$

(k — константа скорости инактивации, K_a — константа диссоциации кислотной группы, $[H^+]$ — концентрация протонов в растворе), которое позволяет определить pK_a реагирующих групп. Они составили 7.85 ± 0.15 и 7.40 ± 0.10 для “быстрой” и “медленной” стадий соответственно. Следует обратить внимание на аномально высокие значения

pK_a для остатков дикарбоновых аминокислот, реагирующих с аминами, – они значительно превышают pK_a ω -карбоксильных групп глутаминовой и аспарагиновой кислот, которые равны соответственно 4.25 и 3.87.

Особенности строения активного центра пиррофосфатазы – причина необычной реакционной способности входящих в него карбоксильных групп

Взаимодействие аминов с карбоновыми кислотами приводит к образованию аммониевых солей. Для получения же амидной связи необходимо либо подвергать пиролизу образующуюся соль, либо предварительно активировать карбоксильную группу. В случае взаимодействия аминов с карбоксильными группами активного центра пиррофосфатазы образование ковалентной связи наблюдается при комнатной температуре и без дополнительной активации, что указывает на необычную реакционную способность этих групп. Как уже отмечалось, значения pK_a карбоксильных групп пиррофосфатазы, вступающих в реакцию с аминами, значительно выше, чем для ω -карбоксильных групп глутаминовой и аспарагиновой кислот. Одной из возможных причин этого может быть влияние других функциональных групп фермента. Подтверждением этого предположения могут служить данные рентгеноструктурного анализа пиррофосфатазы из *E. coli*, согласно которым (рис. 5, [15]) в активный центр фермента обращены 8 ω -карбоксильных групп остатков Glu и Asp, а также три фенольных гидроксила остатков Tyr, три ϵ -аминогруппы остатков Lys и гуанидиновая группа аргинина. В ряде случаев расстояния между карбоксильными группами, а также между ними и другими функциональными группами не превышают 3 Å, что делает весьма вероятным существование водородных связей. Принудительное протонирование карбоксильных групп, следствием чего являются аномально высокие значения их pK_a , повышает электрофильность углеродного атома. Это, по-видимому, и определяет их способность вступать в реакции нуклеофильного замещения. Следовательно, необычная реакционная способность пиррофосфатазы по отношению к аминам, выражающаяся в способности без специальной активации остатков дикарбоновых аминокислот образовывать амидную связь, обусловлена особенностями строения ее активного центра.

Предполагаемый механизм реакции

Пиррофосфатаза – металлозависимый фермент. В состав фермент-субстратного комплекса входят четыре катиона-активатора [16], предполагаемыми лигандами которых являются остатки дикарбоновых аминокислот. Поскольку амины в протони-

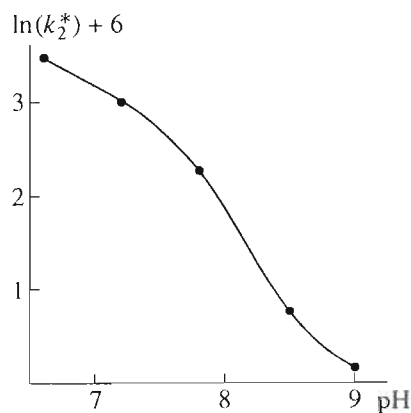


Рис. 4. Зависимость наблюдаемой константы инактивации пиррофосфатазы (“медленная” стадия) от pH реакционной среды в присутствии 30 мМ этилового эфира лейцина при 25°C.

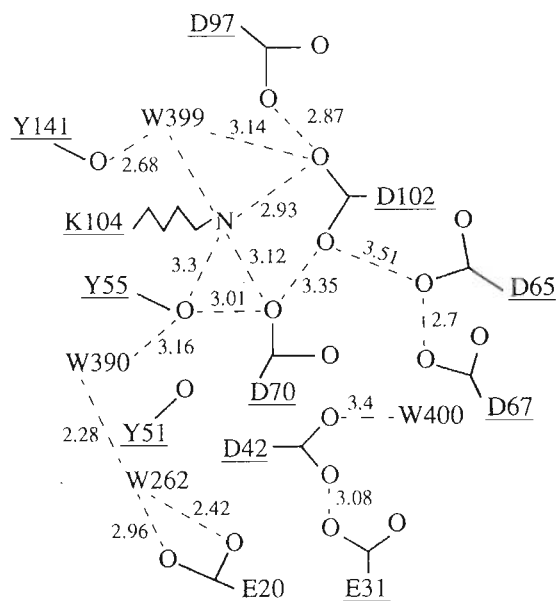
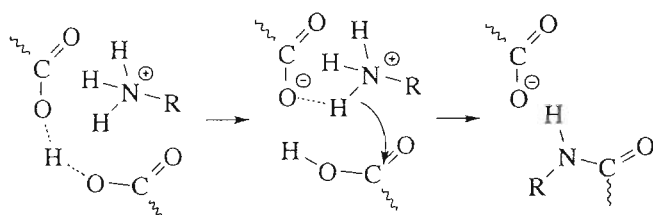


Рис. 5. Схема области активного центра пиррофосфатазы *E. coli* (указаны расстояния (Å) между группами) [15].

рованной форме – положительно заряженные соединения, можно предположить, что они способны взаимодействовать с остатками аминокислот, входящих в центры связывания металлов-активаторов. Это и обеспечивает их специфическое ингибирующее воздействие на пиррофосфатазу. Таким образом, возможен следующий механизм реакции неорганической пиррофосфатазы из *E. coli* с аминами:



Вначале эфиры аминокислот и другие амины связываются в активном центре за счет электростатических взаимодействий с карбоксильными группами. Это, во-первых, фиксирует реагент в активном центре и, во-вторых, увеличивает нуклеофильность атома азота ингибитора. Образование амидной связи становится возможным в результате согласованного связывания протона аммониевой группы ингибитора и образования протонированной карбоксильной группы. В результате происходит химическая модификация активного центра фермента.

Таким образом, эфиры аминокислот и другие исследованные амины являются специфическими необратимыми ингибиторами неорганической пирофосфатазы из *E. coli*. Об этом свидетельствуют:

1) специфическое связывание ингибиторов ферментом с образованием комплекса $[E \cdot I]$ и последующая химическая модификация функционально важных карбоксильных групп;

2) защитный эффект негидролизуемого аналога субстрата – $CaPP_i$ в реакции инактивации фермента исследованными аминами;

3) конкурентный характер ингибирования ферментативного гидролиза субстрата.

Ранее нами для изучения неорганических пирофосфатаз были предложены аффинные ингибиторы – эфиры фосфорной кислоты, являющиеся аналогами неорганического фосфата (продукта гидролазной и субстрата синтетазной активности фермента) [13]. В настоящей работе предложен новый класс специфических необратимых ингибиторов – соединений, содержащих аммониевую группу, которые, вероятно, можно рассматривать как аналоги катионов-активаторов пирофосфатазы.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Фермент и реагенты. Неорганическая пирофосфатаза из *E. coli* с удельной активностью 700 МЕ была получена как описано ранее [17]. В работе использовали метиловый эфир глицина (Reanal, Венгрия), этиловый эфир $[^{14}C]$ глицина (43.5 мКи/ммоль) (Du Pont, NEN Products, США), MOPSO, трис, $CaCl_2$, $MgCl_2$ (Fluka, Швейцария), $Na_4P_2O_7 \cdot 10H_2O$ (PP_i), диализную пленку (Sigma, США), сефадекс G-50, тонкий (Pharmacia, Швеция). Остальные реагенты – отечественного производства.

Определение активности пирофосфатазы проводили по начальной скорости образования P_i из PP_i при $25^\circ C$ с помощью автоматического анализатора фосфата [18]. Стандартная смесь для определения ферментативной активности содержала 1 мМ PP_i и 2 мМ $MgCl_2$ в 50 мМ трис-НСI-буфере, рН 9.0.

Инактивация пирофосфатазы аминами. К раствору фермента (0.25 мкМ в расчете на субъедини-

цу) в 30 мМ MOPSO-NaOH-буфере (рН 6.8) добавляли водный раствор амина или эфира аминокислоты до концентрации 0.2–100 мМ и инкубировали при $25\text{--}37^\circ C$. В контрольном опыте к ферменту вместо амина добавляли водный раствор NaCl. За ходом инактивации следили, измеряя ферментативную активность через определенные промежутки времени.

Изучение устойчивости связи, образуемой между аминами и пирофосфатазой

А. Реакционную смесь, содержащую 0.25 мкМ раствор пирофосфатазы, инактивированной этиловым эфиром лейцина на 50%, разбавляли в 250 раз 50 мМ трис-НСI-буфером (рН 9.0) или 50 мМ MOPSO-NaOH-буфером (рН 6.8) (как в присутствии 0.5 М NaCl, так и без добавления NaCl), выдерживали 60 мин при $25^\circ C$ и определяли ферментативную активность.

Б. 6 мл 2.5 мкМ раствора фермента, инактивированного метиловым эфиром глицина на 40%, диализовали против двух смен (по 5 л) 10 мМ трис-НСI-буфера (рН 7.6) при $22^\circ C$, после чего определяли ферментативную активность.

В. Реакционную смесь (2.5–3.5 мл), содержащую 2.5 мкМ фермент, инактивированный этиловым эфиром $[^{14}C]$ глицина (750 имп/(мин нмоль)) на 35%, нанесли на колонку (1 × 30 см) с сефадексом G-50 (тонкий), уравновешенным 30 мМ MOPSO-NaOH-буфером (рН 6.8). Элюцию проводили тем же буфером. Во фракциях объемом 1 мл определяли содержание белка и радиоактивность. Измерение радиоактивности проводили на жидкостно-сцинтилляционном счетчике (Delta, США) в диоксановом сцинтилляторе ЖС-8.

Кинетика ферментативного гидролиза $MgPP_i$ в присутствии этилового эфира лейцина. Начальную скорость гидролиза 2–100 мкМ $MgPP_i$ в 50 мМ MOPSO-NaOH-буфере (рН 6.8) при фиксированной концентрации свободного Mg^{2+} , равной 5 мМ, определяли с помощью автоматического анализатора фосфата [18]. Концентрацию этилового эфира лейцина варьировали в диапазоне 0–20 мМ. Расчеты общих концентраций Mg^{2+} и PP_i проводили как описано ранее [19].

Определение pK_a группы пирофосфатазы, реагирующей с аминами. Фермент (0.5 мкМ в расчете на субъединицу) инкубировали в присутствии 30 мМ этилового эфира лейцина при рН 6.6, 7.2, 7.8, 8.5 (30 мМ MOPSO-NaOH-буфер) и 7.8, 8.5, 9.0 (30 мМ трис-НСI-буфер) при $25^\circ C$. Через определенные промежутки времени отбирали аликваты для определения активности.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 94-04-12727-а), Международного

научного фонда и Правительства России (грант М1У300), Государственной научно-технической программы "Инженерная энзимология" (грант № 1-35).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cooperman B.S., Baykov A.A., Lahti R. // Trends Biochem. Sci. 1992. V. 17. P. 262–266.
2. Richter O.M., Schafer G. // Eur. J. Biochem. 1992. V. 209. P. 351–355.
3. Teplyakov A., Obmolova G., Wilson K.S., Ishii K., Kajii H., Samejima T., Kuranova I. // Protein Sci. 1994. V. 3. P. 1098–1107.
4. Hansen G., Eifler R., Heitman P. // Acta Biol. Med. Germ. 1972. V. 28. P. 977–987.
5. Wong S.C.K., Josse J. // J. Biol. Chem. 1970. V. 245. P. 4335–4345.
6. 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. // Биоорг. химия. 1984. Т. 10. С. 1469–1482.
7. Арутюнян Э.Г., Оганесян В.Ю., Оганесян Н.Н., Терзян С.С., Попов А.Н., Рубинский С.В., Вайнштейн Б.К., Назарова Т.И., Курилова С.А., Воробьева Н.Н., Аваева С.М. // Кристаллография. 1996. Т. 41. С. 84–96.
8. Gonzales M.A., Cooperman B.S. // Biochemistry. 1986. V. 25. P. 7179–7185.
9. Разников А.В., Егоров Ц.А., Миргородская О.А., Склянкина В.А., Аваева С.М. // Биохимия. 1992. Т. 57. С. 1902–1912.
10. Свято И.Е., Склянкина В.А., Аваева С.М. // Тез. VI Всесоюз. симпоз. по химии белков и пептидов. Рига, 1983. Т. 167–168.
11. Lahti R., Pohjanoksa K., Pitkaranta T., Heikinheimo P., Salminen T., Meyer P., Heinonen J. // Biochemistry. 1990. V. 29. P. 5761–5766.
12. Kapyla J., Huytia T., Goldmann A., Baykov A.A., Cooperman B.S., Lahti R. // Biochemistry. 1995. V. 34. P. 792–800.
13. Sklyankina V.A., Awaeva S.M. // Eur. J. Biochem. 1990. V. 190. P. 195–201.
14. Березин И.В., Клесов А.А. Практический курс химической и ферментативной кинетики. М.: Изд-во МГУ, 1976. С. 34–36.
15. Awaeva S.M., Rodina E.V., Kurilova S.A., Nazarova T.I., Vorobyeva N.N., Harutyunyan E.H., Oganessyan V.Yu. // FEBS Lett. 1995. V. 377. P. 44–46.
16. Baykov A.A., Shestakov A.S., Kasho V.N., Vener A.V., Ivanov A.N. // Eur. J. Biochem. 1990. V. 194. P. 879–887.
17. Oganessyan V.Yu., Kurilova S.A., Vorobyeva N.N., Nazarova T.I., Popov A.N., Lebedev A.A., Awaeva S.M., Harutyunyan E.H. // FEBS Lett. 1994. V. 348. P. 301–304.
18. Baykov A.A., Awaeva S.M. // Anal. Biochem. 1981. V. 116. P. 1–4.
19. Volk S.E., Duzhenko V.S., Baykov A.A., Awaeva S.M. // Eur. J. Biochem. 1982. V. 125. P. 215–220.

Irreversible Specific Inhibition of Inorganic Pyrophosphatase from *Escherichia coli* by Amines

A. V. Burobin, M. V. Lomonova, V. A. Sklyankina, and S. M. Awaeva

Department of Chemistry and Belozerskii Research Institute of Physicochemical Biology,
Moscow State University, Vorob'evy Gory, Moscow, 119899 Russia

Abstract—An unusually high reactivity of the carboxyl groups of the active site of *E. coli* inorganic pyrophosphatase towards amines was shown. Amino acid esters and other amines are specific irreversible inhibitors of the enzyme. The reaction involves the formation of an enzyme–inhibitor complex followed by the chemical modification of dicarboxylic amino acid residues. It is assumed that the binding of the positively charged inhibitor occurs at the binding site of cations-activators.

Key words: inorganic pyrophosphatase, amines, active site, chemical modification.