



УДК 577.152.271\*11'134

## ВЫСОКОСЕЛЕКТИВНОЕ АФФИННОЕ МЕЧЕНИЕ ФОСФОФРУКТОКИНАЗЫ ИЗ *Cottocomephorus growingki*

© 1998 г. И. И. Тулохонов<sup>#</sup>, А. А. Мустаев, Е. Ф. Зайчиков

Лимнологический институт СО РАН,  
664033, Иркутск, ул. Уланбаторская, 3

Поступила в редакцию 5.12.97 г. Принята к печати 12.02.98 г.

Осуществлено высокоселективное аффинное мечение фосфофруктокиназы из *Cottocomephorus growingki*. Аффинную метку вводили с помощью *para*-формилбензилового эфира фруктозо-6-фосфата и  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТР}$ , используя двухстадийную процедуру, что приводило к модификации субъединицы этого фермента с молекулярной массой около 80 кДа. Интенсивность мечения фосфофруктокиназы зависит от присутствия в реакционной смеси эффикторов, таких, как АМР или фруктозо-1,6-дифосфат.

*Ключевые слова:* аффинное мечение, фосфофруктокиназа, активный центр, эффикторы.

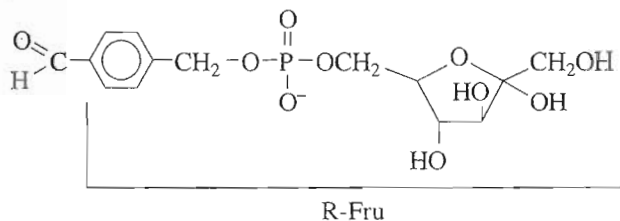
Один из основных подходов, применяемых для изучения активных центров ферментов, основан на введении радиоактивной, флуоресцентной или какой-либо другой метки в район связывания субстратов с помощью их химически активных аналогов. Ранее в нашей лаборатории был предложен метод, обеспечивающий высокоселективное введение радиоактивной метки по участкам связывания РНК-полимераз [1, 2]. Метод основан на эндокаталитическом присоединении радиоактивного субстрата к остатку аналога иницирующего нуклеотида, ковалентно фиксированного в районе активного центра. В настоящее время метод используется для исследования активных центров различных ферментов матричного биосинтеза, таких, как РНК-полимеразы [1-3], в том числе и праймазы [4], ДНК-полимеразы [5]. Несомненный интерес представляет распространение его и на другие ферменты.

Интересным объектом исследования для энзимологов, на наш взгляд, является фосфофруктокиназа - один из ключевых ферментов гликолиза. Фосфофруктокиназа (КФ 2.7.1.11) катализирует фосфорилирование фруктозо-6-фосфата с образованием фруктозо-1,6-дифосфата при участии в качестве второго субстрата АТР. Несмотря на то что фосфофруктокиназа была выделена из ряда организмов и интенсивно изучается последние два десятилетия, механизм ее действия на молекулярном уровне все еще неясен. Некоторый прогресс в этом направлении был обеспечен рентгеноструктурными исследованиями [6, 7] и экспериментами по сайт-направленному мутагенезу [8-10]

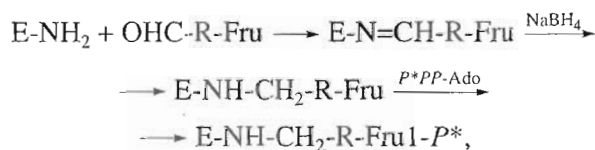
фосфофруктокиназ из *Escherichia coli* и *Bacillus stearothermophilus*. В то же время фосфофруктокиназы из эукариотических организмов мало исследованы, а данные по фосфофруктокиназам из рыб отсутствуют.

В данной работе осуществлена высокоселективная аффинная модификация фосфофруктокиназы, выделенной из байкальского эндемичного бычка *Cottocomephorus growingki*.

В качестве аффинного реагента использован *para*-формилбензильный эфир фруктозо-6-фосфата (*f Bzl*)P6Fru.



Этот реагент содержит альдегидную группу, способную обратимо реагировать с  $\epsilon$ -аминогруппой лизина или  $\alpha$ -аминогруппой *N*-концевой аминокислоты. Восстановление образующегося основания Шиффа с помощью боргидрида натрия приводит к необратимой фиксации остатка аффинного реагента на ферменте. Из схемы высокоселективного аффинного мечения можно видеть, что данная процедура состоит из ряда стадий:



E = фосфофруктокиназа; OHC-R-Fru = (*f Bzl*)P6Fru.

<sup>#</sup>Автор для переписки (факс: (3-952) 46-04-05; e-mail: root@lin.irkutsk.su).

На первой стадии фермент инкубируется с радиоактивным реакционноспособным производным фруктозо-6-фосфата, что приводит к ковалентной сшивке аффинного реагента с ферментом. Модификация может происходить не только по активному центру, но и по другим сайтам. Затем образовавшиеся основания Шиффа восстанавливаются в мягких условиях боргидридом натрия. На следующей стадии модифицированная фосфофруктокиназа инкубируется с радиоактивным  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ . На этой стадии вследствие каталитической активности фермента фосфорилируются только производные фруктозо-6-фосфата, ковалентно сшитые с аминокислотными остатками в активном центре или вблизи него, что приводит к образованию фруктозо-1,6-дифосфата и селективному включению радиоактивной метки в сайт связывания субстрата фермента.

Анализ с помощью денатурирующего гель-электрофореза показал, что радиоактивная метка включается в полипептид с  $M$  около 80 кДа (рис. 1), что соответствует молекулярной массе субъединицы фосфофруктокиназы из *C. grewingki*. Из рис. 1 можно видеть, что включение радиоактивной метки при использовании аффинного реагента в концентрации 3 мМ выше (рис. 1, 4), чем в эксперименте с 1 мМ аффинным реагентом. О том, что модификация происходит селективно, свидетельствуют также следующие данные. Если в процедуре модификации отсутствует стадия обработки боргидридом натрия, метка не включается (рис. 1, 2), значит, реакция идет через образование основания Шиффа. Включение метки не наблюдалось при отсутствии в реакционной смеси реагента, когда фермент инкубировался только с  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  (рис. 1, 3), что свидетельствует о модификации в ферменте фруктозо-6-фосфатсвязывающего центра. При исчерпывающем расщеплении бромцианом по остаткам метионина модифицированного фермента радиоактивная метка наблюдалась только в одном из пептидов, что подтверждает специфичность мечения.

Ранее было показано [11-13], что на активность фосфофруктокиназ влияют различные эффекторы, как активаторы, так и ингибиторы. Известно, что к числу эффекторов для фосфофруктокиназ из *E. coli*, *B. stearothermophilus* и мышц кролика относятся субстраты (АТФ, фруктозо-6-фосфат), продукты реакции (АДР, фруктозо-1,6-дифосфат) и метаболиты, такие, как АМР [11-13]. Для фосфофруктокиназ рыб такие данные отсутствуют. Мы рассмотрели влияние АМР и фруктозо-1,6-дифосфата на модификацию фермента из *C. grewingki*. Было обнаружено, что при одной и той же концентрации аффинного реагента интенсивность мечения увеличивалась в присутствии АМР (рис. 2, 3, 4), тогда как фруктозо-1,6-дифосфат оказывал ингибирующее действие на модификацию фермента (рис. 2, 5, 6). Эти данные сви-

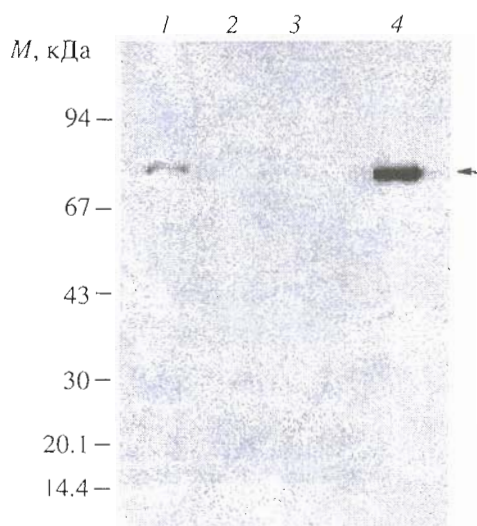
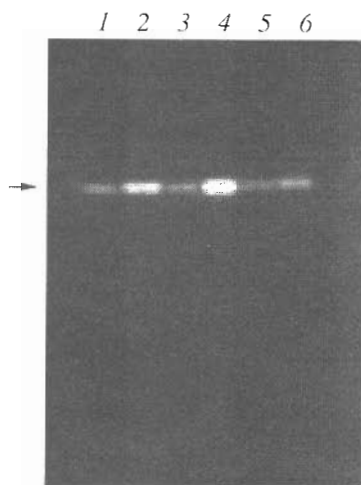


Рис. 1. Радиоавтограф геля-электрофореза реакционных смесей после аффинного мечения фосфофруктокиназы из *C. grewingki* *para*-формилбензиловым эфиром фруктозо-6-фосфата в сочетании с  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ . 1, 4 – инкубация фермента с реагентом в концентрации 1 и 3 мМ соответственно в стандартной реакционной смеси, а также при исключении стадии обработки  $\text{NaBH}_4$  (2); 3 – реакционная смесь без аффинного реагента. М – маркеры молекулярных весов. Стрелкой указано положение фосфофруктокиназы, выявленное окрашиванием геля Кумасси R-250.

детельствуют о том, что АМР и фруктозо-1,6-дифосфат также являются эффекторами для фосфофруктокиназы из *C. grewingki*.

Подобные же результаты были получены при модификации *para*-формилбензиловым эфиром фруктозо-6-фосфата фосфофруктокиназы из мышц близкородственного вида бычков *C. inermis*. На электрофореграмме продуктов расщепления бромцианом модифицированных аффинным реагентом ферментов из *C. grewingki* и *C. inermis* мы наблюдали одинаковый набор пептидов.

Таким образом, результаты по аффинной модификации наряду с ранее полученными нами данными о первичной структуре фрагмента гена фосфофруктокиназы из *C. grewingki* [14] свидетельствуют в пользу предположения о сходстве строения активных центров различных фосфофруктокиназ, в частности о наличии остатка лизина вблизи фруктозо-6-фосфатсвязывающего сайта, выявляемого аффинным реагентом. К сожалению, в настоящее время отсутствуют данные о полной первичной структуре фосфофруктокиназы из *C. grewingki*, что не позволяет нам локализовать положения аминокислотных остатков, ковалентно сшитых с аналогами субстратов.



**Рис. 2.** Радиоавтограф гель-электрофореграммы разделения реакционных смесей после аффинного мечения фосфофруктокиназы из *S. growingki* *para*-формилбензиловым эфиром фруктозо-6-фосфата в сочетании с  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  в присутствии аллостерических эффекторов. 1, 2 – инкубация фермента с реагентом в концентрации 1 и 3 мМ соответственно в стандартной реакционной смеси; 3 – модификация 1 мМ реагентом в присутствии 1 мМ АМР; 4 – 3 мМ реагент и 1 мМ АМР; 5 – 1 мМ реагент и 20 мкМ фруктозо-1,6-дифосфат; 6 – 3 мМ реагент и 20 мкМ фруктозо-1,6-дифосфат. Стрелкой указано положение фосфофруктокиназы, выявленное окрашиванием геля Ку-масси R-250.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали акриламид, бисакриламид, EDTA, Трис, бромциан (Sigma, США); додецилсульфат натрия, глицин, меркаптоэтанол (Serva, Германия); фруктозо-1,6-дифосфат, АМР (Boehringer Mannheim, Германия);  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  (2000 Ки/ммоль, производства НИБХ СО РАН, Новосибирск).

Фосфофруктокиназа из *S. growingki* была выделена согласно методике [15].

***para*-Формилбензиловый эфир фруктозо-6-фосфата.** К раствору триэтиламмониевой соли фруктозо-6-фосфата (70 мкмоль) в 175 мкл DMF добавили 29 мг (146 мкмоль) *para*-формилбензилбромид и 14.6 мкл (84 мкмоль) диизопролилэтиламина и выдерживали 45 мин при 60°C. Для остановки реакции к смеси добавили 100 мкл воды и далее проводили экстракцию эфиром (3 × 1 мл). Водную фазу анализировали методом обращенно-фазовой хроматографии на колонке (7.1 × 250 мм) с сорбентом Octadecyl-Si 100 (3 мкм; Serva, Германия) в линейном градиенте концентрации ацетонитрила (от 0 до 50%) в буфере (рН 9.0), содержащем 50 мМ LiClO<sub>4</sub> и 20 мМ NaHCO<sub>3</sub>. Продукт элюируется 12% ацетонитрилом. Выход *para*-формилбензилового эфира фруктозо-6-фосфата 20–25% относительно исходной триэтиламмониевой соли фруктозо-6-фосфата.

**Аффинная модификация фосфофруктокиназы.** Фосфофруктокиназу ( $10^{-7}$  М) инкубировали 15 мин при 37°C с 0.5–3 мМ *para*-формилбензиловым эфиром фруктозо-6-фосфата в реакционном буфере, содержащем 25 мМ Трис-НСl (рН 7.9), 6 мМ MgCl<sub>2</sub>, 3 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 мМ EDTA, 1 мМ дитиотреит. После этого проводили восстановление 10 мМ боргидридом натрия в течение 30 мин при 4°C. Затем в смесь вводили  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  до концентрации  $10^{-6}$  М и инкубировали 20 мин при 37°C. К реакционной смеси добавляли 1/4 объема денатурирующего раствора (5% SDS, 5% β-меркаптоэтанол, 0.1% бромфеноловый синий, 50% глицерин), выдерживали 15 мин при 56°C и подвергали электрофорезу в 10% ПААГ по Лэммли [16].

Аффинную модификацию в присутствии эффекторов проводили в тех же условиях, только реакционная смесь содержала дополнительно 1 мМ АМР или 20 мкМ фруктозо-1,6-дифосфат.

**Расщепление меченого фермента бромцианом.** После аффинного мечения фермент денатурировали в присутствии 1% SDS 30 мин при 37°C и обрабатывали 100 мМ бромцианом в 0.05 М HCl 15 мин в случае ограниченного расщепления и 2–4 ч в случае исчерпывающего гидролиза. Все процедуры расщепления проводили при 20°C. Реакцию останавливали добавлением β-меркаптоэтанола до концентрации 1% и триэтанолamina (рН 9.0) до 0.2 М. После этого смесь прогревали 15 мин при 56°C и анализировали пробы в градиентном (10–20%) ПААГ в системе Лэммли.

Работа выполнена при частичной поддержке гранта РФФИ (№ 97-04-48310).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Grachev M.A., Mustaev A.A. // FEBS Lett. 1982. V. 137. P. 89–94.
2. Grachev M.A., Lukhtanov E.A., Mustaev A.A., Zaychikov E.F., Abdukayumov M.N., Rabinov I.V., Richter V.I., Skoblov Yu.S., Chistyakov P.G. // Eur. J. Biochem. 1989. V. 180. P. 577–585.
3. Mustaev A., Zaychikov E., Severinov K., Kashlev M., Polyakov A., Nikiforov V., Goldfarb A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994. V. 91. P. 12036–12040.
4. Mustaev A., Godson G.N. // J. Biol. Chem. 1995. V. 270. P. 15711–15718.
5. Mitina R.L., Mustaev A.A., Zaychikov E.F., Khomov V.V., Lavrik O.I. // FEBS Lett. 1990. V. 272. P. 181–183.
6. Shirakihara Y., Evans P.R. // J. Mol. Biol. 1988. V. 204. P. 973–994.
7. Rypniewski W.R., Evans P.R. // J. Mol. Biol. 1989. V. 207. P. 805–821.
8. Berger S.A., Evans P.R. // Biochemistry. 1992. V. 31. P. 9237–9242.
9. Hellinga H.W., Evans P.R. // Nature. 1987. V. 327. P. 437–439.

10. Laine R., Deville-Bonne D., Auzat I., Garel J.-R. // Eur. J. Biochem. 1992. V. 207. P. 1109–1114.
11. Reinhart G.D., Lardy H.A. // Biochemistry. 1980. V. 19. P. 1477–1484.
12. Kemp R.G. // Methods Enzymol. 1975. V. 42. P. 71–77.
13. Kemp R.G., Foe L. // Mol. Cell. Biochem. 1983. V. 57. P. 147–156.
14. Тулохонов И.И., Манакова Е.Н., Флегентов Г.Ю., Беликов С.И., Зайчиков Е.Ф. // Биоорг. химия. 1996. Т. 22. С. 596–598.
15. Ling K.-H., Markus F., Lardy H.A. // J. Biol. Chem. 1965. V. 240. P. 1893–1899.
16. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685.

## A Highly Selective Affinity Labeling of Phosphofructokinase from *Cottocomephorus grewingki*

I. I. Tulokhonov<sup>#</sup>, A. A. Mustaev, and E. F. Zaichikov

*Institute of Limnology, Siberian Division, Russian Academy of Sciences, ul. Ulanbatorskaya 3, Irkutsk, 664033 Russia*

The 80-kDa subunit of phosphofructokinase from the Baikalian fish *Cottocomephorus grewingki* was labeled with high selectivity by a two-stage procedure of affinity labeling using *p*-formylbenzyl fructose 6-phosphate and [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP. The extent of labeling depended on the presence of such effectors as AMP or fructose 1,6-diphosphate in the reaction mixture.

*Key words:* affinity labeling, phosphofructokinase, active site, effectors

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed; fax: +7 (3925) 46-0405; e-mail: root@lin.irkustk.su.