



УДК 577.152.361*1'134:577.112.4

ИНГИБИРОВАНИЕ НЕОРГАНИЧЕСКОЙ ПИРОФОСФАТАЗЫ *Escherichia coli* НЕОРГАНИЧЕСКИМ ФОСФАТОМ

© 2001 г. О. В. Григорьева, В. А. Митькевич, В. А. Склянкина, С. М. Аваева*[#]Химический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова,
Москва, 119899, Воробьевы горы;* Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского
Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва

Поступила в редакцию 07.07.2000 г. Принята к печати 02.08.2000 г.

Исследовано взаимодействие неорганической пирофосфатазы *E. coli* с неорганическим фосфатом (P_i) в широком диапазоне концентраций последнего. Установлено, что апофермент образует с P_i два неактивных соединения – продукт фосфорилирования карбоксильной группы активного центра и прочный комплекс, который можно зарегистрировать в присутствии субстрата. Фосфорилирование протекает с P_i в миллимолярных концентрациях, а для образования комплекса достаточно микромолярных концентраций. Доказательство образования фосфорилированного фермента основывается на чувствительности его к гидроксиламину и изменении свойств неактивного фермента после выдерживания в щелочной среде. Показано, что фосфорилирование пирофосфатазы и образование неактивного комплекса происходит при взаимодействии неорганического фосфата с различными участками активных центров фермента, которые связаны кооперативными взаимодействиями.

Ключевые слова: неорганическая пирофосфатаза; фосфорилирование; инактивация; кооперативность.

ВВЕДЕНИЕ

Неорганическая пирофосфатаза *E. coli* (КФ 3.6.1.1, ЕРР-аза) является гомогексамером и описывается как димер тримеров. Фермент гидролизует неорганический пирофосфат, обеспечивая в клетке соотношение PP_i/P_i , необходимое для эффективного синтеза важнейших биополимеров. Каталитический процесс протекает при связывании в активном центре 3–4 ионов двухвалентных металлов, среди которых наиболее эффективен Mg^{2+} [1, 2]. Согласно принятым представлениям, гидролиз PP_i не сопровождается образованием фосфорилированного фермента [3]. Для ЕРР-азы и фермента из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (УРР-азы) показано фосфорилирование фосфатом в присутствии ионов магния, при этом фосфат связывается вне активного центра, так как фосфорилированный белок обладает полной активностью и не отщепляет фосфат в процессе гидролиза субстрата [4, 5]. В то же время известны природные агенты, способные фосфорилировать фермент по активному центру. Этими соединени-

ями являются моноэфиры фосфорной кислоты, которые представляют собой аналоги продукта ферментативной реакции – фосфата и выступают как аффинные ингибиторы [6]. Свойства фосфорилированного белка, его устойчивость и вытеснение фосфата гидроксиламином свидетельствует об образовании в активном центре ацилфосфатной связи.

Настоящая работа, посвященная исследованию взаимодействия ЕРР-азы с неорганическим фосфатом, показывает, что фермент образует с P_i два неактивных соединения – продукт фосфорилирования группы активного центра и прочный комплекс, не разрушающийся в присутствии субстрата, причем образование этих соединений – результат взаимодействия P_i с различными участками активного центра.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Необратимый характер ингибирования ЕРР-азы неорганическим фосфатом

Изучение взаимодействия ЕРР-азы с фосфатом осложнено двумя обстоятельствами. Во-первых, исследуемый реагент идентичен продукту ферментативной реакции, поэтому выявление влияния реагента на активность требует особого

Сокращения: ЕРР-аза – неорганическая пирофосфатаза *Escherichia coli*; УРР-аза – неорганическая пирофосфатаза *Saccharomyces cerevisiae*; PP_i – неорганический пирофосфат.

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 939-54-35; e-mail: avaeva@genebee.msu.su).

экспериментального подхода (после проведения модификации необходимо резко снижать содержание эффектора до концентраций, которые не мешали бы определению ферментативной активности). Во-вторых, молекула ЕРР-азы имеет 12 потенциальных центров связывания P_i , поскольку фермент состоит из шести субъединиц, и каждый активный центр имеет две площадки связывания фосфата, образующегося из пирофосфата. Известно, что активные центры двух тримеров связаны кооперативными взаимодействиями, проявляющимися при заполнении активных центров лигандами [6, 7]. Кроме того, нельзя исключить взаимодействие между центрами связывания фосфата как внутри одного тримера, так и внутри каждого активного центра. Все эти соображения необходимо было принимать во внимание при постановке эксперимента и интерпретации полученных результатов.

Ферментативную активность определяли двумя способами: в аликвотах реакционной смеси, отобранных через определенные промежутки времени и освобожденных от избытка эффектора гель-фильтрацией, или в аликвотах реакционной смеси, разбавленных до остаточной концентрации фосфата 0.5–20 мкМ.

Взаимодействие ЕРР-азы с фосфатом изучали, инкубируя фермент с 10–50 мМ P_i при рН 7.2. На рис. 1 в качестве примера приведена кинетика реакции с 35 мМ P_i , активность фермента определяли описанными выше способами (кривые 1 и 2 соответственно). Из кривой 1 видно, что процесс инактивации развивается во времени в течение 20 мин, а далее глубина ингибирования практически не изменяется. При этом освобождение инактивированного фермента от избытка ингибитора гель-фильтрацией не приводит к восстановлению активности, что свидетельствует о необратимом характере ингибирования. Медленная реактивация белка наблюдается лишь при выдерживании его при рН 7.2 в течение 2 ч в присутствии PP_i . Инактивированный фермент, освобожденный от избытка реагента, содержит связанный фосфат, количество которого коррелирует со степенью инактивации. Так, включение P_i в ЕРР-азу с остаточной активностью 75 и 52% составляет 1.4 и 3.0 моль P_i /моль фермента, соответственно. Ионы магния в концентрации 0.1–1 мМ обладают защитным эффектом в этой реакции (рис. 1, кривая 3).

Еще одним указанием на образование ковалентной связи при взаимодействии пирофосфатазы с P_i , явились результаты исследования белка, последовательно модифицированного P_i и этиловым эфиром лейцина, методом MALDI-TOF-масс-спектрометрии. Для этого фосфорилированный фермент выдерживали в 8 М мочеvine, обрабатывали этиловым эфиром лейцина и исследовали продукты. Видно из рис. 2, что молекулярная мас-

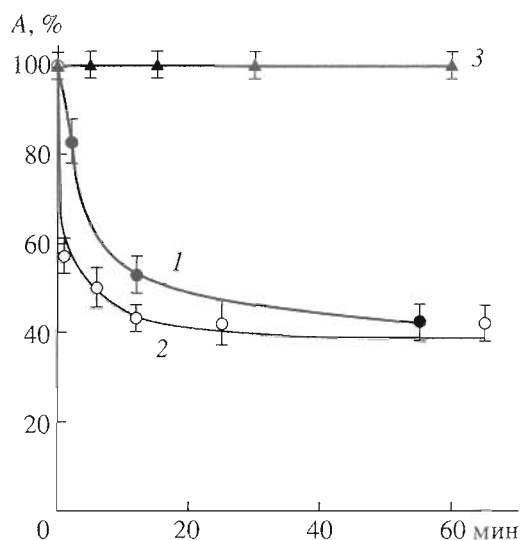


Рис. 1. Зависимость глубины инактивации от времени взаимодействия с P_i . Условия: концентрация фермента 0.75 мкМ, фосфата 35 мМ без ионов Mg^{2+} (1, 2) и в присутствии 1 мМ Mg^{2+} (3), рН 7.2, 25°C. Активность определяли после освобождения от избытка ингибитора гель-фильтрацией (1, 3) или в присутствии 7.0 мкМ P_i (2).

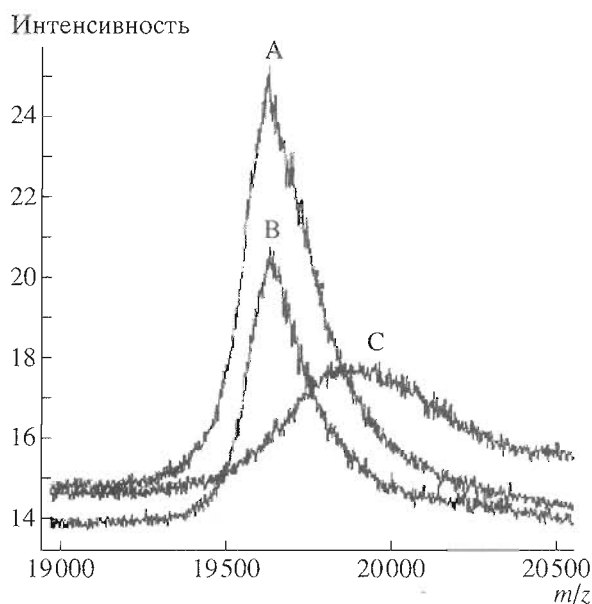


Рис. 2. MALDI-масс-спектры нативной ЕРР-азы (А), ЕРР-азы, модифицированной этиловым эфиром лейцина (В), и ЕРР-азы, последовательно модифицированной фосфатом и этиловым эфиром лейцина (С).

са белка, последовательно модифицированного фосфатом и этиловым эфиром лейцина (M_r 158) увеличивается примерно на 150–200 Да по сравнению с нативным ферментом и с белком, который обрабатывался эфиром лейцина без предварительного фосфорилирования.

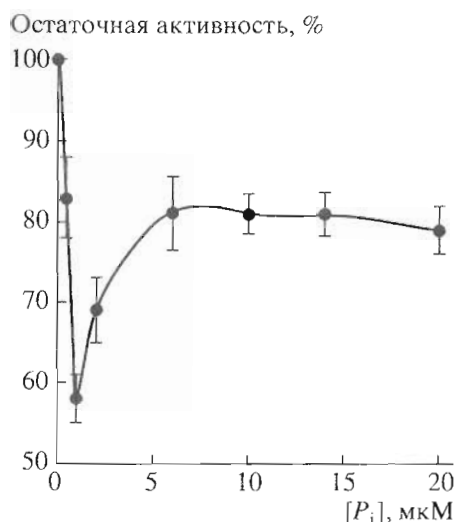


Рис. 3. Влияние микромолярных концентраций неорганического фосфата на активность ЕРР-азы. Условия: концентрация фермента 0.3 мкМ, рН 7.2, 40 мин, 25°C.

При фосфорилировании белков возможно образование ацилфосфатной, фосфоэфирной и фосфоамидной связей. Известно, что образующиеся производные по-разному ведут себя по отношению к гидросиламину. Во всех случаях происходит разрушение связи белка с фосфатом и освобождение P_i , однако только при действии на ацилфосфаты гидросиламин присоединяется к белку, образуя устойчивые гидроксамовые кислоты, и, как следствие, белок остается неактивным и утрачивает способность к реактивации.

Исходя из этого, для идентификации химической природы связи, образующейся при необратимом ингибировании ЕРР-азы фосфатом, фермент, инактивированный неорганическим фосфатом до остаточной активности 50%, выдерживали с гидросиламином. В результате белок не изменял своей активности, но полностью утрачивал способность к реактивации в присутствии пирофосфата.

Еще одним указанием на образование ацилфосфатной связи в белке являются свойства ЕРР-азы, модифицированной неорганическим фосфатом в щелочной среде (рН 9.0). Полученный неактивный белок не восстанавливал активности после гель-фильтрации и последующего длительного выдерживания с PP_i . Ранее аналогичное поведение белка было описано для ЕРР-азы, инактивированной метилфосфатом [8]. Было установлено, что белок, модифицированный при рН 7.5, при переносе его в щелочную среду элиминирует ингибитор, по-видимому, в результате внутримолекулярного ковалентного взаимодействия между карбоксильной группой, образовавшей ацилфосфатную связь с остатком ингиби-

тора, и нуклеофильной группой белка (Lys или Trp). Очевидно, что и в реакции с фосфатом наблюдается аналогичное явление.

Полученные результаты позволяют высказать предположение, что необратимая инактивация ЕРР-азы под действием фосфата является следствием фосфорилирования остатка дикарбоновой аминокислоты фермента.

Образование неактивного комплекса ЕРР-азы с неорганическим фосфатом

Один из методов выявления ингибирующего действия фосфата, использованного в высоких концентрациях, включает сильное разбавление реакционной смеси на стадии определения ферментативной активности. Однако оказалось, что сохранившийся фосфат, даже в очень низких концентрациях (0.5 мкМ и выше), оказывает принципиальное влияние на картину инактивации фермента. На рис. 1 (кривые 1 и 2) сопоставлены условия определения активности фермента после выдерживания его с 35 мМ P_i – после гель-фильтрации и после разбавления до остаточной концентрации P_i 7.0 мкМ. Видно, что в последнем случае уже в начальный момент (через 1.5–2 мин, необходимые для измерения активности) регистрируется резкое падение активности, которое далее незначительно меняется во времени.

Свойства инактивированного белка, полученного при кратковременной инкубации с P_i (около двух минут) принципиально отличались от свойств неактивного фосфорилированного фермента, описанных выше. В этом случае фермент после гель-фильтрации или обработки гидросиламином практически восстанавливал свою каталитическую активность. Это явилось указанием на возможность очень прочного нековалентного связывания неорганического фосфата ЕРР-азой, приводящего к неактивному комплексу, разрушаемому при указанных обработках, и на существование в ферменте еще одного центра связывания P_i .

Для проверки этого предположения была проведена серия экспериментов по исследованию влияния на активность фермента неорганического фосфата, взятого в микромолярных концентрациях. Фермент инкубировали с 0.5–20 мкМ P_i при рН 7.2 и измеряли ферментативную активность через 2 и 40 мин, сохраняя в среде для определения активности такую же концентрацию P_i , как и в инкубационной смеси. Обнаружено сильное ингибирующее действие фосфата на ЕРР-азу (рис. 3). Зависимость имеет U-образный характер, что указывает на существование в гексамерной молекуле нескольких центров связывания фосфата с очень высоким сродством, заполнение которых вызывает противоположные эффекты. Наиболее вероятно, что наблюдаемая закономерность отражает взаимное влияние центров, распо-

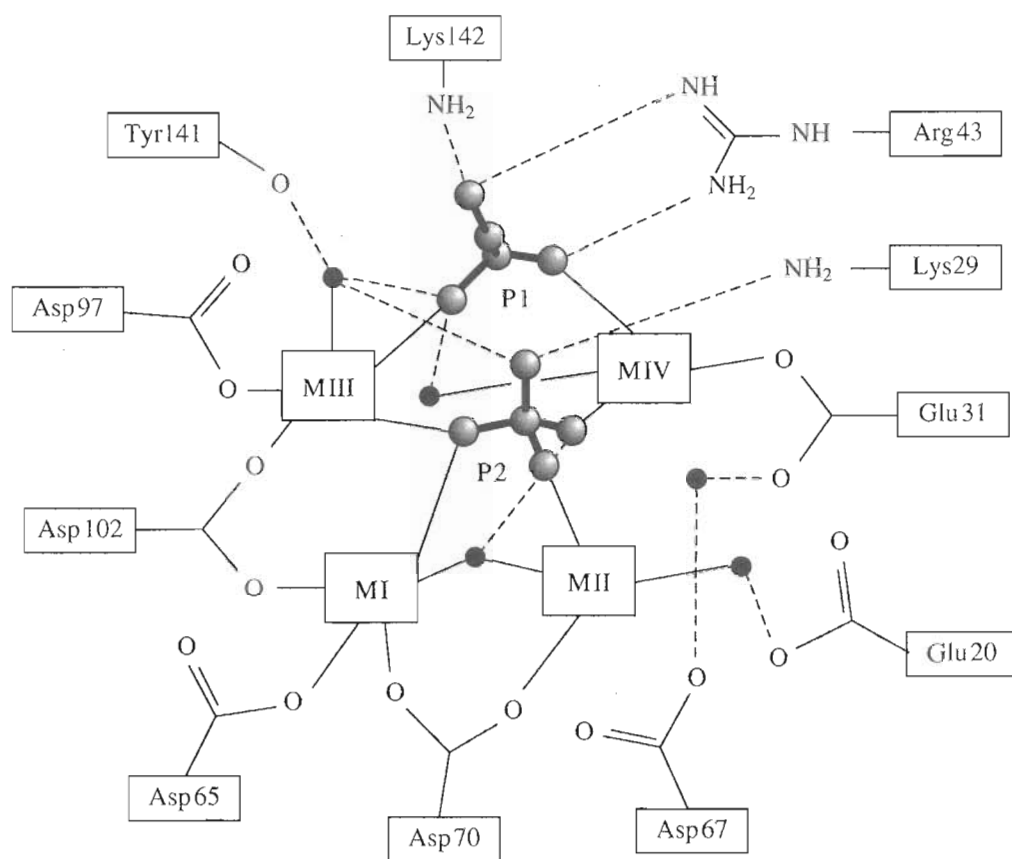


Рис. 4. Схема расположения фосфатов и ионов металлов в активном центре YPP-азы [2]. Нумерация остатков дана в соответствии со структурой EPP-азы. Ионы металла обозначены MI–MIV, их координационные сферы до $n = 6$ дополнены молекулами воды. Последние обозначены маленькими черными кружками и указаны лишь те из них, которые взаимодействуют не только с металлом, но и с другими функциональными группами активного центра. Связи ионов металлов показаны сплошными линиями, водородные связи – пунктирными.

ложенных в разных субъединицах. Ионы магния, добавленные в инкубационную среду, полностью защищают EPP-азу от ингибирования фосфатом. Субстрат ($MgPP_i$) также оказывает защитное действие. Поэтому необходимым условием обнаружения инактивации EPP-азы является добавление неорганического фосфата к ферменту до прибавления субстрата и сохранение его концентрации в среде для определения активности. Средство EPP-азы к фосфату очень велико, максимальный ингибирующий эффект наблюдается при $1 \text{ мкМ } P_i$. Следует отметить, что для YPP-азы и мутантной формы EPP-азы с заменой Asp67 \rightarrow Asp известно существование прочных неактивных комплексов, с эквимолекулярным соотношением фермент–пирофосфат– Mg^{2+} -фторид, которые разрушаются очень медленно после удаления избытка всех реагентов [9, 10].

Основной результат проведенного исследования заключается в обнаружении инактивирующего действия фосфата на EPP-азу. Фермент теряет активность при присоединении P_i в центре с очень высоким средством к нему. При этом для

фосфорилирования EPP-азы, приводящего к необратимой инактивации, необходимо связывание P_i с константой связывания, лежащей в области миллимолярных концентраций P_i , что является указанием на присоединение P_i к двум различным участкам активного центра.

Идентификация центров присоединения фосфата в EPP-азе

Для EPP-азы отсутствуют данные о пространственной структуре комплексов, содержащих субстрат или продукт реакции. Однако, принимая во внимание сходство в строении активных центров в апоформах YPP-азы и EPP-азы, при обсуждении вопроса о местах присоединения P_i к EPP-азе представляется возможным использовать результаты рентгеноструктурного анализа комплекса YPP-азы с ионами марганца и с P_i [2]. Согласно этим данным в активном центре существуют два места присоединения фосфата – P1 и P2, сильно различающиеся по основности формирующих их аминокислот (рис. 4). В центре P1 расположены

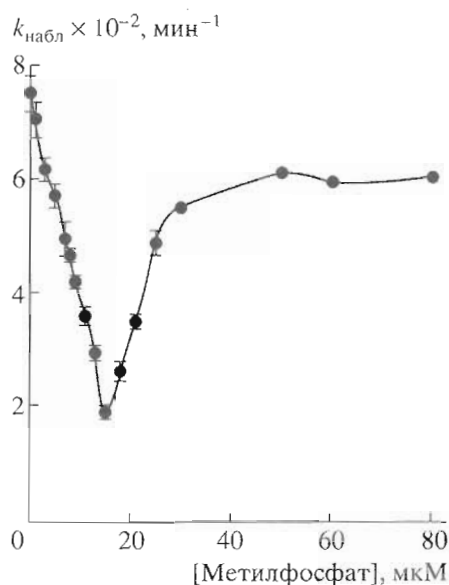


Рис. 5. Зависимость наблюдаемой константы скорости инактивации EPP-азы диацетилом от концентрации метилфосфата в инкубационной смеси. Условия: концентрация фермента 0.3 мкМ, диацетила 15 мМ, рН 7.2, 25°C.

Arg43, Lys142, Tyr141. В центре P2 сосредоточены остатки дикарбоновых аминокислот и Lys29. Из данных рентгеноструктурного анализа известно, что в комплексе EPP-азы с сульфатом, который можно рассматривать как аналог фосфата, сульфат-ион связывается в центре P1 [11] и вызывает появление в молекуле гексамера асимметрии. Можно было думать, что образование неактивного комплекса EPP-азы с P_i также происходит при связывании его в центре P1.

Подтверждение этого предположения получено при изучении влияния фосфата и сульфата на инактивацию EPP-азы при модификации Arg43 диацетилом. EPP-азу выдерживали с диацетилом в присутствии 0.5–1.5 мкМ P_i или 0.4–1.6 мкМ сульфата. Присутствие как P_i , так и сульфат-иона сильно снижает наблюдаемую константу скорости модификации остатка Arg43. Максимальный инактивирующий эффект достигается при концентрации фосфата 1.5 мкМ и сульфата 2 мкМ, при этом скорость инактивации фермента падает в 15 и 7 раз соответственно.

Выше было отмечено, что EPP-аза необратимо инактивируется моноэфирами фосфорной кислоты, что является результатом фосфорилирования остатка дикарбоновой аминокислоты в активном центре фермента [6]. Метилфосфат является структурным аналогом фосфата и сульфата. Поэтому правомерно было предположить, что при концентрациях, сопоставимых с концентрациями P_i , он также может связываться в центре P1. Действительно, было обнаружено, что метилфосфат

оказывает сильное защитное влияние при модификации Arg43 диацетилом (рис. 5). Зависимость наблюдаемой константы скорости инактивации EPP-азы диацетилом от концентрации метилфосфата носит колоколообразный характер. В диапазоне концентраций от 0 до 17 мкМ метилфосфат сильно снижает скорость модификации диацетилом, а дальнейшее увеличение его концентрации до 40 мкМ приводит к уменьшению защитного эффекта. Колоколообразная зависимость наблюдаемой константы скорости модификации остатка аргинина от концентрации метилфосфата отражает различное сродство метилфосфата к центрам P1, расположенным в разных субъединицах. Однако, в отличие от результатов, полученных с P_i , после инкубации EPP-азы с 0.5–20 мкМ метилфосфатом и определения ферментативной активности в среде, содержащей реагент, не наблюдалось изменения активности. По-видимому, образующийся комплекс в отличие от комплекса с фосфатом является лабильным и разрушается при определении активности фермента, что не позволяет регистрировать его, как это описано выше для фосфата.

Таким образом, защитный эффект очень низких концентраций фосфата, сульфата и метилфосфата при модификации аргинина свидетельствует о связывании этих лигандов в P1-месте активного центра. Следовательно, ингибирование EPP-азы фосфатом в микромолярных концентрациях обусловлено присоединением фосфата к центру P1.

Труднее решить вопрос о расположении в молекуле фермента центра, способного взаимодействовать с фосфатом, с образованием ацилфосфатной связи. Можно было вообще усомниться в его существовании и предположить превращение комплекса с фосфатом в центре P1 в устойчивое ковалентное производное. Казалось, что в пользу такого предположения свидетельствует факт уменьшения количества комплекса по мере протекания модификации высокими концентрациями фосфата. Так, зависимость 2 на рис. 1 отражает суммарный эффект инактивации за счет протекания двух процессов – образования неактивного комплекса и образования ацилфосфатной связи, а кривая 1 – только второй процесс. Разница между двумя кривыми отражает вклад в инактивацию EPP-азы комплекса. Видно, как количество комплекса уменьшается во времени, и после инкубации в течение 1 ч кривые 1 и 2 совпадают. Однако сделанное предположение о превращении неактивного комплекса в ковалентное соединение полностью опровергается опытами по длительному выдерживанию комплекса без дополнительного увеличения концентрации P_i : независимо от времени инкубации фермента с микромолярными концентрациями фосфата ковалентное соединение зарегистрировать не удастся.

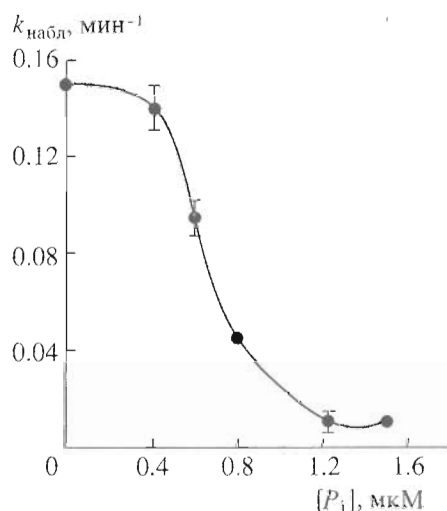


Рис. 6. Зависимость наблюдаемой константы скорости инактивации ЕРР-азы метилфосфатом от концентрации фосфата в инкубационной смеси. Условия: концентрация фермента 0.3 мкМ, метилфосфата 7.2 мМ, рН 7.2, 25°C.

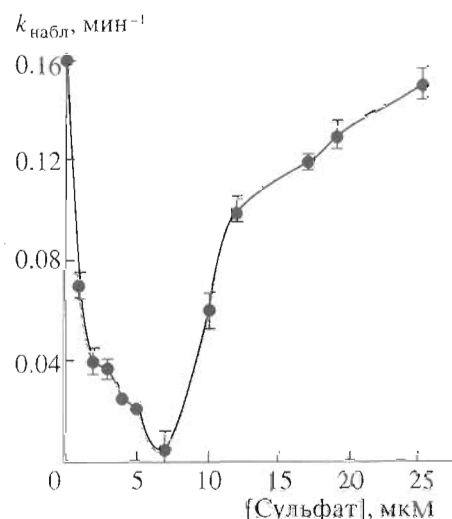


Рис. 7. Зависимость наблюдаемой константы скорости инактивации ЕРР-азы метилфосфатом от концентрации сульфата в инкубационной смеси. Условия: концентрация фермента 0.3 мкМ, метилфосфата 7.2 мМ, рН 7.2, 25°C.

Существование второго центра в ферменте, реагирующего с P_i , подтверждается взаимным влиянием этих центров. ЕРР-азу предварительно инкубировали с фосфатом или сульфатом в микромолярных концентрациях, после чего изучали кинетику инактивации метилфосфатом. Как видно из рис. 6 и 7, ковалентная модификация фермента при взаимодействии его с миллимолярными концентрациями метилфосфата крайне чувствительна к состоянию центра Р1 – заполнение его фосфатом или сульфатом приводит к снижению скорости модификации, и при концентрации P_i равной 1 мкМ и сульфата – 7 мкМ наблюдается полная защита фермента от инактивации. Обратное влияние второго центра на Р1 демонстрирует описанное выше уменьшение вклада неактивного комплекса в общую скорость инактивации фермента по мере фосфорилирования белка, что говорит о резком уменьшении устойчивости комплекса в Р1 при фосфорилировании второго центра.

Возвращаясь к проблеме локализации второго центра в молекуле фермента, можно высказать два предположения. Это может быть центр Р2, входящий в состав того же активного центра, что и Р1. Но не исключено, что он расположен в активном центре другой субъединицы. Тогда столь существенное отличие в их сродстве к фосфату следует объяснить результатом взаимодействия центров. Аналогично такого рода можно найти в известных свойствах ЕРР-азы. Так в тримере, в результате возникающей асимметрии сродство к субстрату соседних активных центров различается на три порядка [7]. Индуцированная взаимодействием с моноэфирами асимметрия гексамерной молекулы находит отражение в фосфорилирова-

нии только одного тримера, при полной пассивности второго, конформация которого определяется строением моноэфира, связанного в соседнем тримере [6]. Однако вопрос о расположении второго центра, взаимодействующего в ЕРР-азе с фосфатом, может быть решен только после локализации в первичной структуре аминокислотного остатка, образующего ацилфосфатную связь. Этой проблеме будет посвящена следующая публикация.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Рекомбинантная неорганическая пирофосфатаза *E. coli* была получена как описано в работе [12]. Удельная активность фермента составила 800 МЕ.

В работе использовали Трис-НСl и диацетил (Merck, Германия) и НЕРЕС (*N*-2-гидроксиэтилпиперазин-*N'*-этансульфоновая кислота)-NaOH (Fluka, Швейцария), пирофосфат натрия и дициклогексиламмониевую соль метилфосфата (Sigma, США), раствор последней перед употреблением пропускали через ионообменник "Dowex" 50W (Serva, Германия); гидроксилламин солянокислый (Реахим, Россия), ос.ч., перед употреблением перекристаллизовывали из 70% раствора спирта. Остальные реактивы были отечественного производства, квалификации не ниже ч.д.а. Все растворы готовили с использованием бидистиллированной и деионизованной воды.

Буферы: 50 мМ Трис-НСl, рН 7.2 (А), 50 мМ НЕРЕС-NaOH, рН 7.2 (Б).

Концентрацию неорганической пирофосфатазы определяли спектрофотометрически, измеряя поглощение растворов белков при 280 нм, с помо-

щью спектрофотометра "Ultrospec 3000" (Pharmacia, Швеция). Концентрации растворов рассчитывали на основании величины $A_{280}^{1\%}$ 1.190 [13].

Ферментативную активность пирофосфатазы определяли, измеряя количество P_i , образующегося при гидролизе пирофосфата, с помощью автоматического анализатора фосфата [14]. Если специально не указано, то стандартная смесь для определения ферментативной активности содержала 50 мкМ пирофосфат натрия и 2 мМ хлорид магния в буфере А.

Инактивация пирофосфатазы миллимолярными концентрациями неорганического фосфата. (1) ЕРР-азу (0.75 мкМ в расчете на субъединицу) инкубировали в буфере Б, содержащем неорганический фосфат в концентрации 10–50 мМ при 25°C. Через определенные промежутки времени аликвоты реакционной смеси освобождали от избытка ингибитора гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-50 (тонкий), уравновешенным тем же буфером. Собирали фракции, содержащие фермент, и определяли ферментативную активность. Контрольным являлся эксперимент, в котором пирофосфатаза выдерживалась в буферном растворе без добавления неорганического фосфата.

(2) К раствору фермента (0.3–0.8 мкМ) в буфере Б или в буфере А, рН 9.0, добавляли раствор фосфата до концентрации 10–50 мМ и инкубировали при 25°C. За ходом инактивации следили, измеряя через определенные промежутки времени (0–65 мин) ферментативную активность в аликвотах инкубационной смеси, разбавленных в 5000 раз. В контрольном опыте белок выдерживали в тех же условиях, но без фосфата.

Инактивация неорганической пирофосфатазы микромолярными концентрациями неорганического фосфата. ЕРР-азу (0.3–0.8 мкМ) инкубировали в буфере Б, рН 7.2, содержащем 0.5–20 мкМ неорганический фосфат, при 25°C. За ходом инактивации следили, измеряя ферментативную активность через 2 и 40 мин, сохраняя в среде для определения активности такую же концентрацию фосфата, как и в реакционной смеси. Контрольным являлся эксперимент, в котором измерение ферментативной активности проводилось без добавления P_i .

Взаимодействие модифицированной пирофосфатазы с гидроксиламином. Фермент (0.8 мкМ), инактивированный 30 мМ неорганическим фосфатом на 50% в буфере Б, рН 7.2, освобождали от избытка реагента гель-фильтрацией как описано выше. К объединенным фракциям, содержащим фермент, прибавляли гидроксилламин до концентрации 1 М, инкубировали 10 мин, после чего изучали способность фермента к реактивации.

Реактивация модифицированной ЕРР-азы. Раствор фермента (0.8 мкМ), инактивированного 50 мМ неорганическим фосфатом на 50%, разбавляли буфером А, содержащим 1 мМ пирофосфат натрия, и инкубировали 2 ч при 25°C, после чего определяли ферментативную активность. Контролем служила система, не содержащая пирофосфат, либо система с немодифицированным белком.

Количественное определение содержания фосфата в инактивированной пирофосфатазе. Фермент (22 мкМ), инактивированный 33 мМ фосфатом на 25 и 52% при рН 7.2, освобождали от избытка ингибитора гель-хроматографией. Объединенные белковые фракции подкисляли до рН 3 добавлением концентрированной соляной кислоты или прибавляли гидроксилламин до концентрации 0.1 М. Инкубировали 30 мин и определяли количество отщепившегося фосфата на автоматическом анализаторе.

Последовательная модификация пирофосфатазы неорганическим фосфатом и этиловым эфиром лейцина. Фермент (2.5 мкМ) инкубировали 2 ч в буфере Б, содержащем 30 мМ фосфат, лиофилизовали и инкубировали в 8 М мочеvine 3 ч при 37°C. После этого к образцам прибавляли раствор этилового эфира лейцина (рН 7.5) до концентрации 0.1 М, через 40 мин проводили гель-хроматографию при 25°C на колонке с сефадексом G-50 (тонкий), уравновешенным деионизованной водой. В качестве контроля использовали фермент, прошедший все стадии обработки, но не подвергавшийся фосфорилированию.

Масс-спектрометрический анализ модифицированных белков проводили в ИБХ им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН на времяпротетном масс-спектрометре "Vision 2000" с ионизацией лазером (MALDI-TOF). Все эксперименты проводились в режиме отражения.

Образцы смешивали с матричным раствором, состоящим из дигидроксибензойной кислоты, растворенной в ацетонитриле и 0.1% трифторуксусной кислоте в соотношении 1 : 1. Концентрация белков составляла около 5 пмоль. Анализируемую смесь наносили на мишень из нержавеющей стали и высушивали при комнатной температуре.

Инактивация неорганической пирофосфатазы из *E. coli* под действием метилфосфата в присутствии сульфата, фосфата. Фермент (0.25 мкМ) инкубировали в буфере Б, содержащем 1–40 мкМ сульфат или 0.1–1.6 мкМ фосфат, в течение 40 мин при 25°C, затем к смеси добавляли раствор метилфосфата до концентрации 5–9 мМ, рН 7.2; в контрольном опыте белок выдерживали с метилфосфатом, но без добавок. Через определенные промежутки времени (0–50 мин) отбирали аликвоты для определения ферментативной активности.

Инактивация пирогосфатазы под действием диацетила в присутствии метилфосфата, фосфата, сульфата. Фермент (0.25 мкМ) инкубировали в буфере Б, содержащем 1–60 мкМ сульфат или 1–20 мкМ фосфат, или 5–120 мкМ метилфосфат, в течение 40 мин при 25°C, затем к смеси добавляли диацетил до концентрации 15 мМ. В контрольном опыте белок выдерживали в тех же условиях, но без добавок. Через определенные промежутки времени (0–50 мин) отбирали аликвоты для определения ферментативной активности.

Расчет констант скоростей и констант связывания. Наблюдаемые константы скорости инактивации ЕРР-азы метилфосфатом и диацетилом рассчитывали с помощью программы "Enzfitter biosoft".

Авторы благодарны к.х.н. Т.И. Назаровой, к.х.н. С.А. Куриловой и к.х.н. Н.Н. Воробьевой за предоставление фермента, а также М.В. Серебряковой за помощь в выполнении масс-спектрометрической части работы.

Данная работа выполнена при поддержке грантов Российского фонда фундаментальных исследований № 97-04-50031 и 96-15-97966.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Baykov A., Schestakov A., Kasho V., Vener A., Ivanov A. // Eur. J. Biochem. 1994. V. 194. P. 879–887.
2. Harutyunyan E.H., Kuranova I.P., Vainstein B.K., Hıçne W.E., Lamzin V.S., Dauter Z., Teplyakov A.V., Wilson K.S. // Eur. J. Biochem. 1996. V. 239. P. 220–228.
3. Gonzales M.A., Webb M.R., Welsh K.M., Cooperman B.S. // Biochemistry. 1984. V. 23. P. 797–801.
4. Назарова Т.И., Аваева С.М. // Биохимия. 1973. V. 38. P. 552–555.
5. Курилова С.А., Назарова Т.И., Аваева С.М. // Биоорганическая химия. 1984. Т. 10. С. 1336–1341.
6. Sklyankina V.A., Avaeva S.M. // Eur. J. Biochem. 1990. V. 191. P. 195–201.
7. Avaeva S., Grigorieva O., Mitkevich V., Sklyankina V., Varfolomeev S. // FEBS Lett. 1999. V. 464. P. 169–173.
8. Григорьева О.В., Склянкина В.А., Аваева С.М. // Вестник Моск. ун-та. Серия 2. Химия. 1996. Т. 37. С. 616–617.
9. Смирнова И.Н., Байков А.А. // Биохимия. 1983. Т. 48. С. 1643–1653.
10. Аваева С.М., Величко Т.И., Воробьева Н.Н., Курилова С.А., Назарова Т.И., Склянкина В.А. // Биохимия. 1999. Т. 64. С. 212–218.
11. Avaeva S., Kurilova S., Nazarova T., Rodina E., Voroyeva N., Sklyankina V., Grigorjeva O., Harutyunyan E., Oganessyan V., Wilson K., Dauter Z., Huber R. // FEBS Lett. 1997. V. 410. P. 502–508.
12. Oganessyan V.Yu., Kurilova S.A., Vorobyeva N.N., Nazarova T.I., Popov A.N., Lebedev A.A., Avaeva S.M., Harutyunyan E.H. // FEBS Lett. 1994. V. 348. P. 301–304.
13. Lahti R., Pitkaranta T., Valve E., Ilta I., Kukko-Kalske R., Heinonen J. // J. Bacteriol. 1988. V. 170. P. 5901–5907.
14. Baykov A.A., Avaeva S.M. // Anal. Biochem. 1981. V. 116. P. 1–4.

Inhibition of Inorganic Pyrophosphatase from *Escherichia coli* with Inorganic Phosphate

O. V. Grigorieva*, V. A. Mit'kevich*, V. A. Sklyankina*, and S. M. Avaeva**#

*Moscow State University, Chemical Department, Vorob'evy gory, Moscow, 119899 Russia

**Belozersky Institute of Physicochemical Biology, Moscow State University, Vorob'evy gory, Moscow, 119899 Russia

The interaction of inorganic pyrophosphatase from *E. coli* with inorganic phosphate (P_i) was studied in a wide concentration range of phosphate. The apoenzyme gives two inactive compounds with P_i , a product of phosphorylation of the carboxylic group of the active site and a stable complex, which can be detected in the presence of the substrate. The phosphorylation occurs when P_i is added on a millimole concentration scale, and micromole concentrations are sufficient for the formation of the complex. The formation of the phosphorylated enzyme was confirmed by its sensitivity to hydroxylamine and a change in the properties of the inactive enzyme upon its incubation in alkaline medium. The phosphorylation of pyrophosphatase and the formation of the inactive complex occur upon interaction of inorganic phosphate with different subsites of the enzyme active sites, which are connected by cooperative interactions.

Key words: inorganic pyrophosphatase, phosphorylation, inactivation, cooperativity

To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (095) 939-5435; e-mail: avaeva@genebee.msu.su.

For the full text of English translation of this article, see *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2001, vol. 27, no. 1. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru/>.