



УДК 577.153.35

**О-ПИРОФОСФОЭТАНОЛАМИН — НОВЫЙ СУБСТРАТ
НЕОРГАНИЧЕСКОЙ ПИРОФОСФАТАЗЫ ИЗ ДРОЖЖЕЙ.
СИНТЕЗ И СУБСТРАТНЫЕ СВОЙСТВА**

*Кузнецов А. В., Аваева С. М., Байков А. А.,
Склянкина В. А.*

*Межфакультетская лаборатория биоорганической химии
и молекулярной биологии им. А. Н. Белозерского
Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова*

Предложен простой путь синтеза О-пирофосфоэтанолamina — нового субстрата неорганической пирофосфатазы из дрожжей. Ферментативный гидролиз его требует ионов цинка и не идет в присутствии ионов магния. Оптимум скорости гидролиза лежит в области pH 6,5—8,0. Определена константа диссоциации комплекса О-пирофосфоэтанолamina с цинком и кинетические константы ферментативного гидролиза. Сравнительно большая прочность комплекса О-пирофосфоэтанолamina с ферментом ($K_S = 0,168$ мМ) показывает, что это соединение может быть использовано для создания субстратоподобных ингибиторов.

Широко распространенным приемом, используемым при изучении строения и топографии активных центров ферментов, является модификация их бифункциональными соединениями, построенными на основе субстратов. Применение этого подхода для изучения неорганической пирофосфатазы из дрожжей ограничено отсутствием доступных субстратов, которые могут быть превращены введением новых функциональных групп в субстратоподобные ингибиторы. Неорганическая пирофосфатаза характеризуется строгой специфичностью. Она гидролизует только пиро- и триполифосфаты и их моноэфир; диэфиры пирофосфорной кислоты не расщепляются ферментом [1—3]. Из описанных субстратов для создания субстратоподобных ингибиторов могут быть использованы либо серилпирофосфаты, либо нуклеозидди- и трифосфаты. Однако первые соединения труднодоступны, а модификация вторых приводит к резкому ухудшению их субстратных свойств [4, 5].

В настоящей работе предложен простой и удобный путь синтеза О-пирофосфоэтанолamina (I), нового субстрата неорганической пирофосфатазы из дрожжей, и изучены его субстратные свойства.

Присутствие пирофосфорной группы в этом соединении обеспечивает связывание его в активном центре пирофосфатазы, а наличие аминогруппы делает возможным использование его для создания субстратоподобных ингибиторов введением различных реакционноспособных группировок.

Синтез О-пирофосфоэтанолamina проводили по методу, описанному для получения пирофосфатов тиаминa [6]. Этанолamin фосфорилировали смесью полифосфатов, образующихся при нагревании ортофосфорной кислоты.

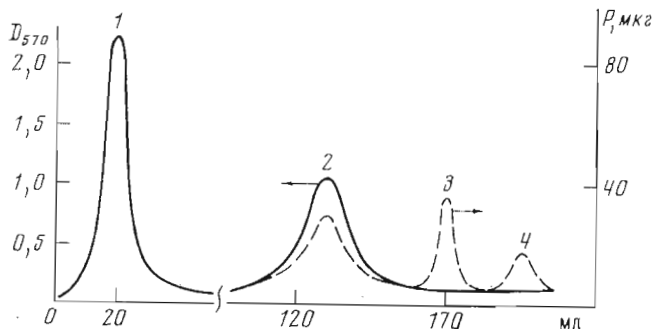


Рис. 1. Разделение реакционной смеси, образующейся при синтезе О-пирофосфоэтанолamina на анионообменной смоле дауэкс 1 × 2 (НСОO⁻-форма)

Как показал хроматографический анализ, реакционная смесь содержит два фосфорилированных производных этанолamina: О-фосфоэтанолamin и О-пирофосфоэтанолamin. Для разделения продуктов реакции была применена хроматография на анионообменной смоле дауэкс 1 × 2 (НСОO⁻-форма) с градиентной элюцией от 0,1 М муравьиной кислоты до 2 М формиата пиридина (рис. 1). Вещества элюируются с колонки в следующей последовательности: О-фосфоэтанолamin (пик 1), О-пирофосфоэтанолamin (пик 2), ортофосфат (пик 3), неорганический пирофосфат (пик 4). Фракции, соответствующие второму пику, собирали, упаривали в вакууме с водой и освобождали от пиридина на катионообменной смоле дауэкс 50 × 8. О-Пирофосфоэтанолamin получен в виде масла с выходом 40%. Он был гомогенен по данным хроматографического и электрофоретического анализа. Его структура была подтверждена определением соотношения азота и фосфора и элементным составом. Содержание фосфора в О-пирофосфоэтанолamine определяли после минерализации соединения в 60% НСЮ₄, а количество аминогрупп — реакцией тринитрофенилирования (табл. 1).

Таблица 1

Характеристики соединений, образующихся при синтезе О-пирофосфоэтанолamina

№ пика	Соединение	Соотношение N/P	R _f	Подвижность, см ² /В·с
1	О-Фосфоэтанолamin	1,15	0,47	—
2	О-Пирофосфоэтанолamin	0,52	0,26	1,1 · 10 ⁻⁴

Таблица 2

Определение константы диссоциации комплекса О-пирофосфоэтанолamina с цинком
25°, 0,05 М буфер пиперазин — бис-этансульфонат NaOH, pH 6,3

[M] ₀ , мМ	[S] ₀ , мМ	[M], мМ	K ₀ , мМ	[M] ₀ , мМ	[S] ₀ , мМ	[M], мМ	K ₀ , мМ
1,85	0,52	1,45	0,35	2,24	1,12	0,555	0,35
	1,04	1,075	0,41		1,35	0,505	0,41
	1,57	0,86	0,5		1,58	0,425	0,395
	2,1	0,63	0,45		1,8	0,363	0,38
	2,61	0,48	0,435		2,03	0,325	0,38
	3,14	0,38	0,43		2,25	0,29	0,395
	3,66	0,3	0,41		2,48	0,26	0,4
	4,2	0,25	0,40		2,7	0,225	0,37
	4,7	0,195	0,405		2,92	0,21	0,385
	1,24	0,45	0,91		0,33	K ₀ (средняя) = 0,39 ± 0,01 мМ	
0,675		0,775	0,35				
0,9		0,655	0,335				

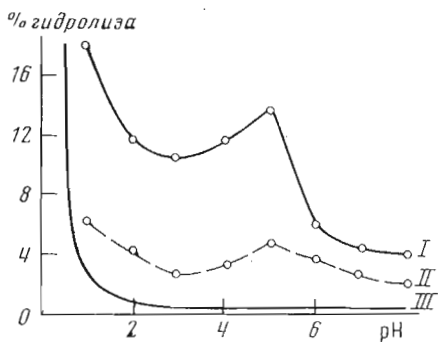


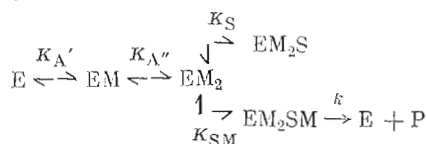
Рис. 2. Влияние pH на гидролиз пирофосфорной связи в пирофосфатах этаноламина (I, II) и серина (III) (3 ч, 52°)

обладает наименьшей устойчивостью. Так, при pH 5 O-пирофосфоэтанол-амин разрушается на 15%, в то время как N-ацетил-O-пирофосфоэтанол-амин — на 5%, а серилпирофосфат устойчив. По-видимому, это результат внутримолекулярного катализа гидролиза пирофосфорной связи в O-пирофосфоэтанол-амине близко расположенной положительно заряженной аминогруппой.

Неорганическая пирофосфатаза является эффективным катализатором гидролиза пирофосфорной связи в O-пирофосфоэтанол-амине в присутствии ионов цинка. Типичная кривая ферментативного гидролиза соединения (I), активируемого Zn^{2+} , приведена на рис. 3. Оказалось, что в присутствии катионов магния, которые служат наилучшим активатором гидролиза неорганического пирофосфата, соединение (I) не расщепляется ферментом. Этот факт находится в соответствии с существующими представлениями о специфичности пирофосфатазной реакции в отношении металла-активатора.

Влияние pH на скорость ферментативного расщепления O-пирофосфоэтанол-амин показано на рис. 4. Видно, что скорость максимальна в области pH 6,5—8.

Поскольку O-пирофосфоэтанол-амин в дальнейшем предполагается использовать для создания субстратоподобных ингибиторов, необходимо было определить прочность комплексов, образуемых этим соединением с пирофосфатазой. С этой целью был проведен анализ зависимости начальной скорости ферментативной реакции от концентрации свободных форм субстрата и металла-активатора на основании схемы реакции, установленной ранее [8] для гидролиза основного субстрата этого фермента — неорганического пирофосфата:



Согласно этой схеме, субстрат (S) и его комплекс с металлом (SM) присоединяются к ферменту только после того, как последний связал два катиона металла (M), причем каталитически активен только комплекс EM_2SM .

Для расчета концентраций комплекса SM и свободных форм S и M необходимо знать константу диссоциации комплекса субстрат — активатор — K_0 . Она была определена с помощью катиончувствительного электрода. Для расчета K_0 было использовано соотношение

$$K_0 = \frac{[M]([S]_0 - [M]_0 + [M])}{[M]_0 - [M]}, \quad (1)$$

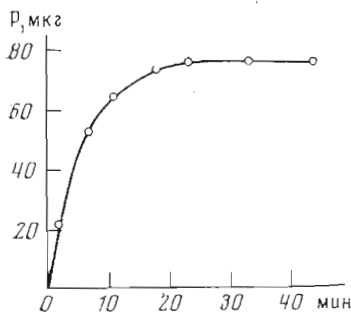


Рис. 3

Рис. 3. Кинетическая кривая гидролиза О-пирофосфоэтанолamina неорганической пирофосфатазой из дрожжей ($1,5 \cdot 10^{-4}$ М О-пирофосфоэтанол-амин, $3 \cdot 10^{-4}$ М $ZnCl_2$, 10^{-7} М фермент, 25° , объем 10 мл)

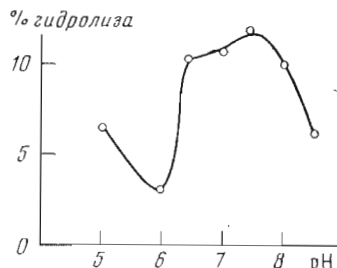


Рис. 4

Рис. 4. рН-зависимость гидролиза О-пирофосфоэтанолamina неорганической пирофосфатазой ($2 \cdot 10^{-3}$ М О-пирофосфоэтанолamin, $5 \cdot 10^{-3}$ М $ZnCl_2$, 10^{-7} М фермент, 20 мин, 30°)

где $[M]$ — концентрация свободной формы металла, измеряемая ионоселективным электродом; $[S]_0$ и $[M]_0$ — общие концентрации субстрата и металла. Как следует из результатов определений (табл. 2), изменение содержания лиганда и металла не вызывает систематического изменения K_0 . Это означает, что в использованных условиях не происходит образования комплексов типа S_2M или SM_2 . Зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации комплекса SM при нескольких фиксированных значениях $[M]$ приведена на рис. 5 в обратных координатах.

На рис. 6 показаны вторичные зависимости наклона прямых ($K_{m, \text{эф}}/V_{\text{эф}}$) и отрезка, отсекаемого на оси ординат ($1/V_{\text{эф}}$), от обратной концентрации свободного активатора. Вид полученных кривых подтверждает правильность схемы, выбранной при допущении равновесной кинетики. Действительно, уравнение скорости процесса, протекающего по этой схеме, имеет следующий вид:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V} \left[1 + \frac{K_0 K_{SM}}{K_S [M]} + \frac{K_{SM}}{[SM]} \left(1 + \frac{K_A'}{[M]} + \frac{K_A' K_A''}{[M]^2} \right) \right]. \quad (2)$$

При фиксированной концентрации свободного металла это уравнение в координатах $1/v$ от $1/[SM]$ описывает прямую линию:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\text{эф}}} + \frac{K_{m, \text{эф}}}{V_{\text{эф}}} \cdot \frac{1}{[SM]} \quad (3)$$

с параметрами

$$\frac{1}{V_{\text{эф}}} = \frac{1}{V} \left(1 + \frac{K_0 K_{SM}}{K_S [M]} \right), \quad (4)$$

$$\frac{K_{m, \text{эф}}}{V_{\text{эф}}} = \frac{K_{SM}}{V} \left(1 + \frac{K_A'}{[M]} + \frac{K_A' K_A''}{[M]^2} \right). \quad (5)$$

Данные рис. 6 подтверждают линейный характер зависимости $1/V_{\text{эф}}$ и параболический — для $K_{m, \text{эф}}/V_{\text{эф}}$ от $1/[M]$.

Численные значения констант, входящие в уравнение (2), были рассчитаны с помощью ЭВМ методом линейной регрессии [9] (табл. 3). Кроме

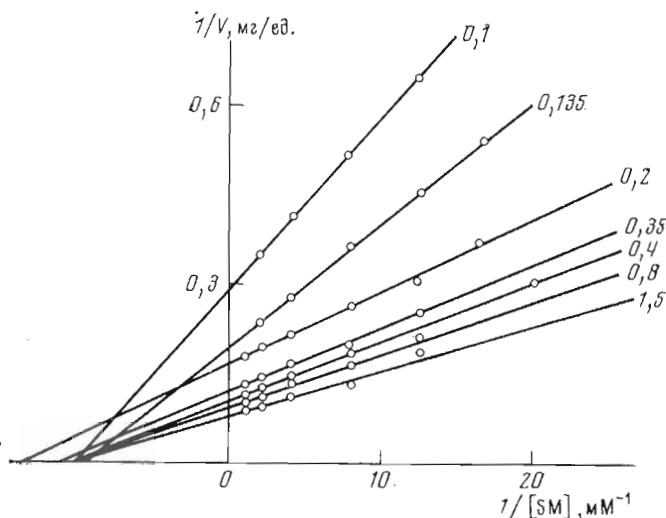


Рис. 5. Зависимость начальной скорости ферментативной реакции от концентрации комплекса О-пирофосфоэтаноламин—цинк при фиксированных концентрациях свободной формы металла (цифры у прямых соответствуют концентрациям Zn^{2+} в мМ)

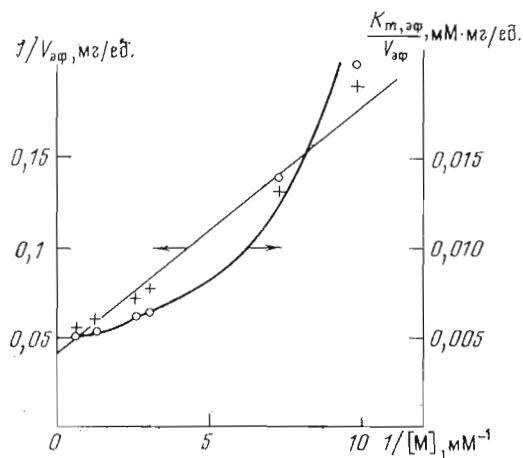


Рис. 6. Зависимость параметров прямых на рис. 5 от концентрации Zn^{2+} (точки соответствуют экспериментальным результатам, кривые получены расчетным путем по уравнениям (6) и (7) с использованием параметров, приведенных в табл. 3)

того, была произведена оценка констант диссоциации комплексов EM и EM_2 . По этим данным, $K_A'' \leq 0,04$ и $K_A' \geq 0,7$ мМ. Следовательно, второй атом металла связывается ферментом лучше по сравнению с первым.

Как видно из табл. 3, значения констант K_S и K_{SM} близки, т. е. фермент примерно одинаково связывает О-пирофосфоэтаноламин и его комплекс с цинком. Сравнение субстратных свойств О-пирофосфоэтанолamina и ранее изученных субстратов показывает, что комплекс О-пирофосфоэтанолamina с цинком хуже связывается ферментом, чем комплекс Mg — пирофосфат

[8, 10], но лучше, чем комплекс $Zn-ATP$ [11], а относительные величины V для гидролиза *O*-пирофосфоэтанолamina, пирофосфата и ATP располагаются в следующем ряду: 1 : 40 : 0,7.

Сравнительно хорошее связывание нового субстрата неорганической пирофосфатазой ($K_S = 0,169$ мМ) позволяет использовать это соединение для создания субстратоподобных ингибиторов.

Экспериментальная часть

O-Пирофосфоэтанолamin (I) был получен фосфорилированием этаноламина смесью полифосфатов, образующихся при нагревании ортофосфорной кислоты. 20 мл концентрированной (85%) ортофосфорной кислоты нагревали на открытом пламени горелки 30—60 мин до появления слабой мути. Полученную смесь охлаждали до комнатной температуры и при перемешивании прибавляли 2 мл (0,033 моль) свежеперегнанного этаноламина. Реакционную смесь выдерживали 25 мин при 130°, охлаждали, добавляли 20 мл воды и фосфорилированные производные этаноламина осаждали 1 л ацетона. Выпавшее масло растворяли в минимальном количестве воды и хроматографировали на анионообменной смоле дауэкс 1 × 2 ($HCOO^-$ -форма) на колонке 1,8 × 40 см. Элюцию проводили постоянно возрастающим градиентом от 0,1 М муравьиной кислоты до 2 М формиата пиридина. Скорость элюции 0,4 мл/мин, объем фракций 2 мл. Фракции элюата анализировали с нингидрином и на содержание фосфора. Содержание фосфора в соединении определяли по методу [12]. График разделения веществ, образующихся при синтезе, представлен на рис. 1. Соединение, находящееся в пиках 1—4, идентифицировали хроматографически в системе изопропанол — вода — трихлоруксусная кислота — аммиак (75 : 25 : 5 : 0,3) и электрофоретически в 0,1 М пиридин-ацетатном буфере, рН 5,5 (2500 В, 40 мин). Элюаты, соответствующие пикам 1 и 2, упаривали многократно с водой в вакууме до исчезновения запаха пиридина. Пиридиновые соли фосфорилированных производных этаноламина переводили в свободные кислоты встряхиванием их водных растворов с катионообменной смолой дауэкс 50 × 8 (H^+ -форма). Для полученных соединений (пики 1 и 2) определяли соотношение азота и фосфора. Содержание фосфора в соединениях определяли по методу [13], количество аминокрупп измеряли реакцией с 2,4,6-тринитробензолсульфокислотой [14]. Характеристика полученных соединений представлена в табл. 1. *O*-Пирофосфоэтанолamin получен в виде стекловидной массы. Выход 40%. Найдено, %: С 10,3; Н 4,3; N 6,0; Р 27,7. $C_2H_9O_7NP_2$. Вычислено, %: С 10,8; Н 4,07; N 6,3; Р 28,05.

N-Ацетил-*O*-пирофосфоэтанолamin (II) получали ацилированием *O*-пирофосфоэтанолamina. К 100 мг (450 ммоль) *O*-пирофосфоэтанолamina в 1 мл воды прибавляли 70 мкг (1,2 ммоль) свежеперегнанного уксусного ангидрида, устанавливали рН раствора равным 7,5 и реакционную смесь выдерживали 3 ч при 0°. Растворитель упаривали в вакууме. *N*-Ацетил-*O*-пирофосфоэтанолamin получен в виде стекловидной массы. Выход количественный. R_f в системе изопропанол — вода — трихлоруксусная кислота — аммиак (75 : 25 : 5 : 0,3) — 0,32.

Неорганическую пирофосфатазу выделяли из маточных пекарских дрожжей по методу Купермана [15] или Брага [16]. Полученный препарат имел удельную активность 805 Е/мг.

В работе использовали Трис (Merck, ФРГ) и пиперазин-бис-этансульфонат (Sigma, Англия), соли двухвалентных металлов, этаноламин, пирофосфат и фосфат отечественного производства марки х. ч.

Гидролитическую устойчивость пирофосфатов этаноламина исследовали в интервале рН 1—8. В опытах использовали следующие буферные растворы: 0,05 М ацетатный буфер, рН 1—5; 0,05 М Трис-малеатный буфер, рН 5—8. Раствор *O*-пирофосфоэтанолamina ($5 \cdot 10^{-3}$ М) в соответствующем

Кинетические параметры гидролиза О-пирофосфоэтанолamina
пирофосфатазой в присутствии ионов цинка
25°, 0,05 М буфер пиперазин - бис-этансульфонат - NaOH, pH 6,3

Константы	Величина ± средне- квадратическая ошибка	Константы	Величина ± средне- квадратическая ошибка
V K_{SM}	22,1±1,4 ед/мг 128±16 мкМ	K_s $K_A' \cdot K_A''$	169±16 мкМ 27±7 мкМ ²

буфере выдерживали 3 ч при 52°, охлаждали и определяли количество неорганического фосфата, как в работе [17].

Ферментативный гидролиз О-пирофосфоэтанолamina исследовали в интервале pH 5,0—8,5. Использовали 0,05 М Трис-малеатные буферы и 0,05 М буфер пиперазин-бис-этансульфонат — NaOH. Ферментативную реакцию останавливали добавлением 0,2 мл 1 М раствора серной кислоты и определяли количество образующегося неорганического фосфата [17].

Начальные скорости ферментативного гидролиза О-пирофосфоэтанолamina определяли на автоматическом анализаторе фосфата, работающем в непрерывном режиме [17] с чувствительностью $5 \cdot 10^{-5}$ М фосфора на полную шкалу самописца. Скорость поглощения реакционной смеси 2,5 мл/мин. Реакцию проводили в термостатированном сосуде, снабженном магнитной мешалкой. Объем реакционной смеси 10 мл.

Концентрацию свободной формы иона Zn^{2+} в смесях $ZnCl_2$ с О-пирофосфоэтанолaminом определяли с помощью ионселективного электрода модели 92-32 (Orion Research, США) в паре с электродом сравнения 80-01 этой же фирмы. Разность потенциалов измеряли на pH-метре pHМ 26 (Radiometer, Дания) и переводили в концентрацию Zn^{2+} с помощью калибровочной зависимости. Общий объем смеси 10 мл. Для нахождения параметров уравнений использовали программу для линейной регрессии [9]. Расчеты выполняли на ЭВМ БЭСМ-3.

ЛИТЕРАТУРА

- Schlesinger M. J., Coon M. J. (1960) *Biochim. et biophys. acta*, **41**, 30—36.
- Kunitz M. (1962) *J. Gen. Physiol.*, **45**, 31—46.
- Avaeva S. M., Fölsch G., Strid L., Mellander O. (1963) *Acta chem. scand.*, **17**, 2718—2723.
- Аваева С. М., Кара-Мурза С. М., Ботвинник М. М. (1966) *Ж. орган. химии*, **36**, 1509—1513.
- Плаксина Е. А., Скляпкина В. А., Аваева С. М. (1975) *Биоорган. химия*, **4**, 558—561.
- Viscontini M., Boneti G., Harrer P. (1949) *Helv. chim. acta*, **32**, 1478—1491.
- Аваева С. М., Раськова Н. В., Ботвинник М. М. (1970) *Вестн. МГУ. Сер. хим.*, **1**, 96—98.
- Braga E. A., Avaeva S. M. (1972) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **49**, 528—535.
- Николаева Л. С. (1968) Программы по регрессионному и коэффицентному анализу, Репринт № 9, Изд-во МГУ.
- Мое О. А., Butler L. G. (1972) *J. Biol. Chem.*, **247**, 7308—7314.
- Шафранский Ю. А., Брага Э. А., Аваева С. М. (1973) *Биохимия*, **38**, 417—419.
- Hanes C., Ischerwood F. (1949) *Nature*, **164**, 1107—1112.
- Weil-Malherbe H., Green R. H. (1951) *Biochem. J.*, **49**, 286—292.
- Goldfarb A. R. (1966) *Biochemistry*, **5**, 2570—2574.
- Cooperman B. S., Chiu N. Y., Bruckmann R. H., Bunick G. J., McKenna G. P. (1973) *Biochemistry*, **12**, 1665—1669.
- Брага Э. А., Байков А. А., Аваева С. М. (1973) *Биохимия*, **38**, 344—350.
- Вайков А. А., Аваева С. М. (1974) *Eur. J. Biochem.*, **47**, 57—66.

Поступила в редакцию
10.XII.1976

O-PYROPHOSPHOETHANOLAMINE, A NEW SUBSTRATE OF YEAST INORGANIC PYROPHOSPHATASE. THE SYNTHESIS AND SUBSTRATE PROPERTIES.

KUZNETSOV A. V., AVAEVA S. M., BAYKOV A. A.,
SKLYANKINA V. A.

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

O-Pyrophosphoethanolamine, a new substrate of yeast inorganic pyrophosphatase has been prepared. The hydrolysis stability of this compound was studied over pH 1-8 range. Maximal lability of a pyrophosphoric bond was observed in a strongly acidic medium. Besides, the increase in the hydrolysis rate was observed at pH 5.0. O-Pyrophosphoethanolamine is hydrolyzed by yeast pyrophosphatase in the presence of zinc ions but not in the presence of magnesium ions. The maximal rate of hydrolysis was observed at pH 6,5-8,0. The dissociation constant of O-pyrophosphoethanolamine-Zn²⁺ complex and the kinetic constants for the interaction of O-pyrophosphoethanolamine with yeast inorganic pyrophosphatase in the presence of zinc ions were determined at pH 6.3.
