



УДК 577.153.35

КАТИОННЫЙ КЛАСТЕР АМИНОКИСЛОТНЫХ ОСТАТКОВ НЕОРГАНИЧЕСКОЙ ПИРОФОСФАТАЗЫ *Escherichia coli* КАК ВОЗМОЖНЫЙ ЦЕНТР СВЯЗЫВАНИЯ ЭФФЕКТОРА

© 2005 г. Т. С. Ситник^{##}, С. М. Аваева^{**}

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, 119899, Москва, Воробьевы горы;

**Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ, Москва
Поступила в редакцию 19.07.2004 г. Принята к печати 30.09.2004 г.

С целью локализации в пиррофосфатазе из *Escherichia coli* центра, способного связывать свободный пиррофосфат (PP_i) или его аналог – метилendisфосфонат (PCP) и активизировать посредством этого фермент, проведен компьютерный анализ молекулы фермента. Выявлен кластер положительно заряженных аминокислот, образованный остатками Lys146, Lys148, Lys115 и Arg43, и получены Lys115Ala-, Lys148Gln- и Arg43Gln-пиррофосфатазы (PPases). Показано, что кинетика гидролиза субстрата – пиррофосфата магния (MgPP_i) этими мутантными вариантами не подчиняется уравнению Михаэлиса–Ментен, что формально выражается в наличии двух наклонов при представлении данных скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата в двойных обратных координатах. Два участка на кривых соответствуют областям высоких и низких концентраций MgPP_i. Такое поведение подтверждает тот факт, что во всех мутантных вариантах фермента происходит ухудшение связывания PP_i в эффекторном центре, в то время как сродство MgPP_i к активному центру практически не меняется. Подробно изучены другие свойства ферментов: олигомерное состояние, устойчивость к термической денатурации, к действию денатурирующего агента – гуанидингидрохлорида. Также определены константы связывания Mg²⁺ с мутантными ферментами в отсутствие субстрата и с фермент-субстратными комплексами. Показано, что введение аминокислотных замен стабилизирует белковую глобулу.

Ключевые слова: неорганическая пиррофосфатаза, мутантные варианты, эффекторный центр.

ВВЕДЕНИЕ

Основная функция неорганических пиррофосфатаз (КФ 3.6.1.1) в клетке заключается в гидролизе пиррофосфата, образующегося как побочный продукт при синтезе многих биополимеров – в первую очередь белков и нуклеиновых кислот. Эти процессы равновесные и гидролиз пиррофосфата смещает их в сторону синтеза.

Наиболее изученным ферментом этого класса является неорганическая пиррофосфатаза из *Escherichia coli* (PPase). Это – гексамер, состоящий из шести одинаковых субъединиц, в каждой субъединице есть активный центр, в котором связываются субстрат – пиррофосфат магния (MgPP_i) и четыре иона металла. Два иона металла связываются в отсутствие субстрата в центрах M1 и M2. M3 – это место связывания субстратного иона металла, этот центр вместе с M4 заполняется только в присутствии MgPP_i [1].

Недавно при изучении кинетики гидролиза субстрата тримерной формой нативной PPase было обнаружено, что в каждой субъединице фермента есть еще один функциональный центр, который получил название эффекторного. Он способен связывать пиррофосфат (PP_i) или его негидролизующий аналог – метилendisфосфонат (PCP), что приводит к активации фермента [2].

При ухудшении связывания эффектора (PP_i) кинетика гидролиза субстрата переставала описываться уравнением Михаэлиса–Ментен и в двойных обратных координатах это формально выражалось в наличии двух наклонов, соответствующих двум диапазонам концентраций субстрата. Для описания полученных результатов была предложена схема, предусматривающая заполнение в каждой субъединице двух центров [3].

Важным подтверждением существования центра, отличного от активного, явились опыты по равновесной гель-фильтрации фермента с негидролизующим аналогом субстрата – CaPP_i [4]. При этом наблюдалось включение двух меченых молекул [³²P]PP_i в каждую субъединицу фермента. Посколь-

Сокращения: NEPEP – N-2-гидроксиэтилпиперазин-N'-2-этансульфоновая кислота; MES – 4-морфолин-этансульфоновая кислота.

[#]Автор для переписки (тел.: (095) 939-53-62; факс: (095) 939-31-81; эл. почта: tatiy@mail.ru).

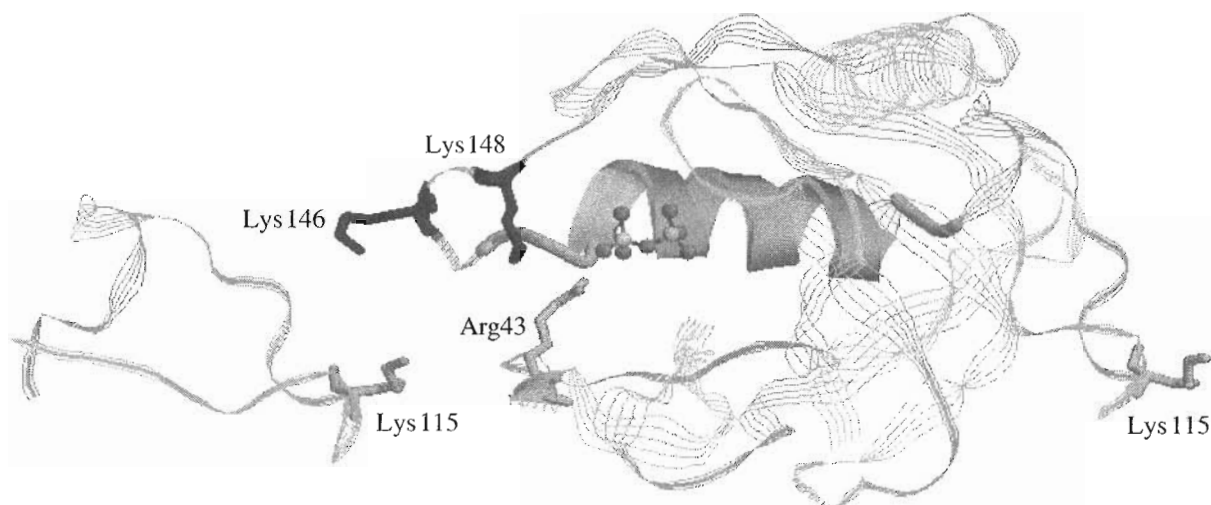


Рис. 1. Аминокислотные остатки PPase, образующие катионный кластер. Сферами обозначена молекула пиррофосфата в активном центре. При создании рисунка использованы данные PCA [5] в виде 1140.pdb (<http://www.rcsb.org/pdb/>).

ку одна из них связывается в активном центре, то другая, следовательно, должна находиться вне его.

Настоящая работа направлена на локализацию эффекторного центра. Поскольку пиррофосфат является полианионом, его потенциальными акцепторами в молекуле белка могут быть остатки положительно заряженных аминокислот. Используя данные PCA [5], на поверхности белка был найден кластер, в состав которого входят остатки Lys146, Lys148, Lys115 и Arg43 (рис. 1). Остатки Lys146 и Lys148 принадлежат наиболее неупорядоченному участку полипептидной цепи – петле 144–149. Данная петля плотно примыкает к α -спирали 127–143, остатки которой одной стороной участвуют в образовании межтримерного контакта, а другой формируют активный центр. Остаток Arg43 является прямым лигандом субстрата в активном центре, но в отсутствие субстрата он уходит из активного центра на поверхность. Четвертым участником этого кластера является остаток Lys115, который приходит в эту область из соседней субъединицы тримера.

Для определения роли этих аминокислотных остатков в формировании эффекторного центра с помощью сайт-направленного мутагенеза были получены следующие формы PPase: остаток Lys115 заменен на Ala, Lys148 – на Gln и Arg43 – на Gln. Изучение свойств этих мутантных белков показало, что, действительно, для них характерно ослабление сродства PP_i к эффекторному центру.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение мутантных вариантов

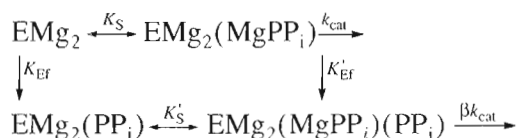
Замены аминокислотных остатков проводились таким образом, чтобы убрать их положительный заряд. Для введения сайт-направленных мутаций в ген PPase использовали двухстадийную полиме-

разную цепную реакцию с применением трех праймеров. Синтезированные и очищенные гены мутантных белков лигировали с плазмидой pUC19 и проводили отбор рекомбинантных клонов как описано в работе [6]. Секвенирование модифицированных генов показало, что они все несут только нужные мутации. Соответствующие белки были выделены в гомогенном состоянии.

Седиментационный анализ при pH 7.5 показал, что все мутантные варианты и фермент дикого типа являются гексамерами, коэффициент седиментации $s = 6.2 \pm 0.3$ S.

Кинетика гидролиза субстрата гексамерными формами Lys115Ala-, Lys148Gln-, Arg43Gln-PPase

Изучение кинетики гидролиза субстрата ферментами, содержащими замены в катионном кластере, показало, что, в отличие от нативного фермента, для них характерно ярко выраженное отклонение от уравнения Михаэлиса–Ментен. Особенно четко видна нелинейность при представлении данных в двойных обратных координатах (рис. 2). Для описания полученных результатов использована схема гидролиза в присутствии эффектора, предложенная ранее [3]:



Согласно схеме, скорость гидролиза $MgPP_i$ – v , при данной концентрации Mg^{2+} описывается уравнением (1) (при допущении, что константы диссоциации комплексов с эффектором (PP_i) и с субстратом ($MgPP_i$) не зависят от их порядка присоединения к ферменту):

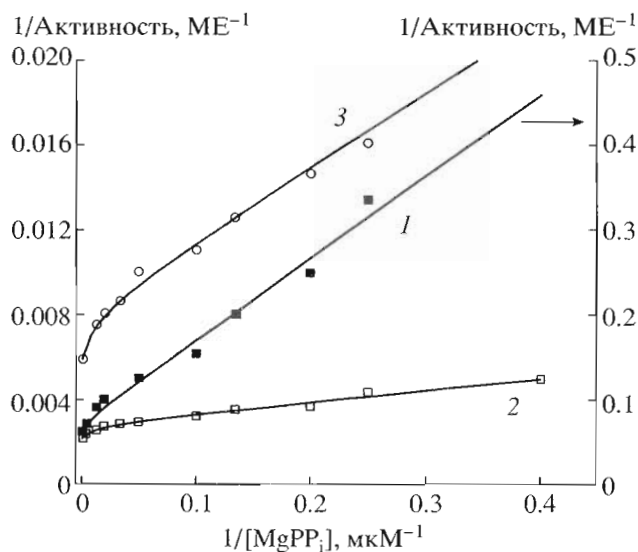


Рис. 2. Зависимость скорости гидролиза $MgPP_i$ мутантными PPases: Arg43Gln (1), Lys115Ala (2), Lys148Gln (3). Данные представлены в двойных обратных координатах.

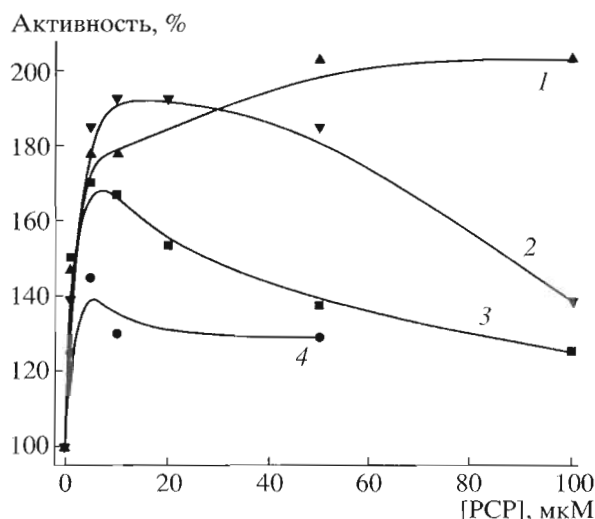


Рис. 3. Зависимость от содержания РСР в реакционной среде скорости гидролиза $MgPP_i$ нативной (2) и мутантными PPases: Arg43Gln (1), Lys115Ala (3), Lys148Gln (4); pH 6.0; $[MgPP_i]$ 10 мкМ, $[Mg^{2+}]$ 10 мМ. За 100% принята активность ферментов в отсутствие РСР.

$$v = \frac{V_{\max}(1 + \beta K_d[S]/K_{Ef}[Mg^{2+}])[S]}{K_S + (1 + K_S K_d/K_{Ef}[Mg^{2+}])[S] + K_d[S]^2/K_{Ef}[Mg^{2+}]}, \quad (1)$$

где V_{\max} – максимальная скорость гидролиза в данных условиях, β – коэффициент увеличения скорости гидролиза под действием эффектора, K_S и K_{Ef} – константы диссоциации комплексов фермент-субстрат и фермент-эффектор соответственно, K_d – константа диссоциации комплекса $MgPP_i$ при фиксированном значении pH.

В кинетических экспериментах реакционная смесь всегда содержит одновременно и субстрат и пирофосфат, так как они связаны равновесием:



Для мутантных ферментов, согласно приведенной схеме и уравнению (1), определены кинетические константы (табл. 1). Из таблицы видно, что для мутантных вариантов фермента происходит ухудшение сродства PP_i к эффекторному центру (K_{Ef}), по крайней мере, на порядок по сравнению с нативным ферментом (WT). Для нативной PPase при pH 7.5 не удастся оценить K_{Ef} , так как сродство PP_i к эффекторному центру настолько высоко, что он уже заполнен во всем исследуемом диапазоне концентраций субстрата. Эту величину для нативного фермента удастся оценить только при pH 6.0, когда сродство всех лигандов к центрам сильно ослаблено, в том числе и PP_i к эффекторному центру [4]. Но и в этом случае константа K_{Ef} на порядок лучше по сравнению с мутантными вариантами фермента.

Однако стоит отметить, что данные мутации практически не отразились на связывании субстрата (K_S) в активном центре, константы диссоциации остались такими же, как для WT-PPase при pH 7.5 и лежат в районе 1–3 мкМ [6]. Исключение составляет Arg43Gln-PPase, у которой K_S составляет около 6 мкМ. Для Arg43Gln-PPase характерно также значительное снижение каталитической активности – до 2% от активности нативного фермента, для которого V_{\max} при pH 7.5 составляет 450 ME [7]. Поскольку остаток Arg43 является прямым лигандом субстрата в активном центре и координирует уходящий фосфат после его гидролиза, такой результат неудивителен.

Таблица 1. Кинетические параметры гидролиза $MgPP_i$ гексамерами мутантных PPases при pH 7.5 и нативной PPase (WT) при pH 6.0, рассчитанные по уравнению (1)

PPase*	V_{\max} , ME	β	K_S , мкМ	K_{Ef} , мкМ
Lys115Ala	329 ± 16	1.8 ± 0.1	1.0 ± 0.2	3.7 ± 1.6
Lys148Gln	122 ± 5	1.5 ± 0.1	3.5 ± 0.6	3.2 ± 1.2
Arg43Gln	7.2 ± 0.5	2.5 ± 0.2	6.2 ± 0.7	3.5 ± 0.7
WT [3]	48 ± 5	2.5 ± 0.1	12 ± 2	0.44 ± 0.38

* Здесь и далее название PPases по месту их мутации.

Таблица 2. Параметры, рассчитанные из данных дифференциальной сканирующей калориметрии, для нативной PPase и ее мутантных вариантов

PPase	$T_{пл}$, °C	ΔH , кДж/моль	h^*
WT	72.8	437.1	6.1
Lys115Ala	78.9	476.5	5
Lys148Gln	81.2	600.5	5.2
Arg43Gln	85.6	475.5	3.8

* Параметр, характеризующий ширину пика на половине его высоты.

Таблица 3. Денатурация нативной пирофосфатазы и ее мутантных вариантов под действием гуанидингидрохлорида, параметры рассчитаны по уравнению (3) [9, 10]

PPase	$[\text{GuHCl}]_{1/2}$, М	$\Delta G_{ден}(\text{H}_2\text{O})$, кДж/моль	m , кДж/(моль М)
WT	4.6	272 ± 19	-27.3 ± 4.2
Lys115Ala	4.7	343 ± 15	-39.8 ± 3.0
Lys148Gln	4.6	370 ± 39	-47.7 ± 8.7
Arg43Gln	4.8	889 ± 13	-26.8 ± 2.8

Влияние метилendifосфоната на гидролиз субстрата мутантными вариантами

Факт активации фермента под действием метилendifосфоната (PCP) является прямым подтверждением того, что это соединение связывается с ферментом в центре, отличном от активного [3]. В настоящей работе также была изучена кинетика гидролиза MgPP_i мутантными вариантами в присутствии PCP и было показано, что все мутантные варианты активируются этим реагентом в области концентраций ниже 20 мкМ (рис. 3). Снижение степени активации при дальнейшем росте концентрации PCP связано с параллельным увеличением концентрации комплекса MgPCP , который, по-видимому, начинает конкурировать с субстратом за связывание в активном центре. Следует заметить, что для фермента с заменой Arg43 на Gln ингибирования не наблюдается, то есть для этого фермента типично ухудшение связывания в активном центре не только MgPP_i , но и MgPCP .

Строго говоря, утверждение, что изменение свойств эффекторного центра обусловлено только заменой основных аминокислот на нейтральные, становится справедливым только в том случае, если другие свойства мутантных белков остались без изменений. В связи с этим были охарактеризованы термическая и химическая денатурация белков, способность мутантных белков к диссоциации и родство к металлам-активаторам.

Термическая и химическая устойчивость ферментов

Термическую стабильность нативной PPase и полученных мутантных ее вариантов характеризовали методом дифференциальной сканирующей калориметрии [8]. Термическую денатурацию проводили на адиабатическом калориметре в диапазоне температур 40–100°C. Все мутантные варианты плавятся при более высокой температуре, чем нативный фермент (рис. 4), и обладают более высоким значением энthalпии тепловой денатурации (табл. 2). Величина h в табл. 2 характеризует кооперативность плавления белковой глобулы: чем меньше эта величина, тем более кооперативно плавится белок и, следовательно, тем более компактной структурой он обладает. Из табл. 2 видно, что кооперативность плавления выше у Arg43Gln-PPase, тогда как у двух других мутантных вариантов эта величина мало отличается от нативного фермента.

Увеличение стабильности при введении мутаций вытекает также из опытов по химической денатурации под действием гуанидингидрохлорида (GuHCl). Химическую денатурацию нативной PPase и ее мутантных вариантов проводили в равновесных условиях. Ферменты инкубировали с 0–8 М GuHCl в течение 20–24 ч и измеряли остаточную каталитическую активность. Поскольку ферменты проявляют полную активность только в свернутом состоянии, то падение активности коррелирует со снижением доли свернутых молекул. Отсутствие дополнительных ступеней на графике зависимости активности от концентрации GuHCl (рис. 5) свидетельствует о том, что денатурацию PPases можно рассматривать как простую мономолекулярную реакцию, когда белок переходит из одного состояния в другое без промежуточных термодинамически устойчивых состояний. Действительно, только нативное и денатурированное состояния белковой молекулы регистрируются в достоверных количествах. В таких случаях процесс денатурации можно описать с помощью так называемой модели двух состояний [9, 10]. Согласно этой модели по формуле:

$$\Delta G_{ден}(x) = \Delta G_{ден}(\text{H}_2\text{O}) + mx \quad (3)$$

были рассчитаны $\Delta G_{ден}(x)$ и m (табл. 3), где $\Delta G_{ден}(x)$ – энергия денатурации ферментов, m – коэффициент пропорциональности, который является индивидуальной характеристикой белка. Эта величина отражает изменения площади гидрофобной поверхности, обращенной в растворитель при денатурации [11].

Полученные результаты показывают, что все мутантные белки более устойчивы к действию GuHCl и самым устойчивым является Arg43Gln-PPase.

Продемонстрированная выше термическая и химическая устойчивость мутантных белков по

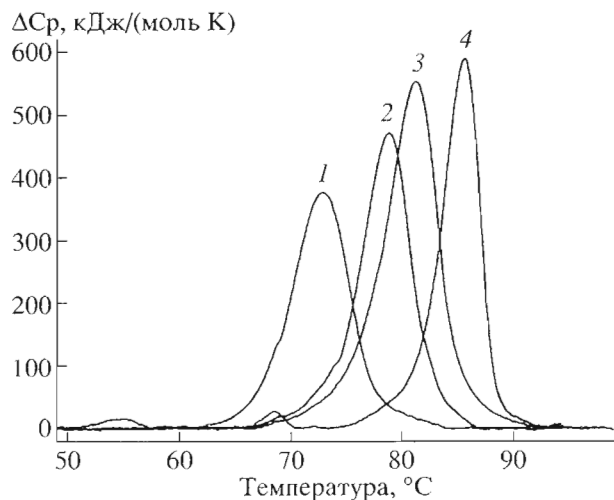


Рис. 4. Дифференциальная сканирующая калориметрия нативной PPase (1) и ее мутантных вариантов: Lys115Ala (2), Lys148Gln (3), Arg43Gln (4).

сравнению с ферментом дикого типа свидетельствует о том, что в результате мутаций в молекулах ферментов произошли изменения в сети нековалентных взаимодействий таким образом, что структура в целом стала более компактной и прочной, а вследствие этого – ферментативная активность снизилась. Ранее такой тип зависимости между структурой и активностью был пока-

зан для мутантных PPases при анализе их пространственных структур [12, 13].

Связывание ионов Mg с ферментом и с фермент-субстратным комплексом

Для характеристики состояния активного центра важно было проверить, повлияли ли введенные мутации на сродство Mg^{2+} к центрам M2 и M4. Центр M1 характеризуется высоким сродством к ионам Mg и оказывается заполненным при очень низких их концентрациях. Спектрофотометрическое титрование нативной PPase и ее мутантных вариантов ионами магния было использовано для определения константы диссоциации Mg^{2+} с ферментом в центре M2 в отсутствие субстрата [14]. Титрование выявило лишь небольшое ухудшение сродства только у Lys115Ala-PPase (табл. 4). Сродство ионов магния в центре M2 в присутствии субстрата вычисляли из зависимости скорости гидролиза субстрата от концентрации Mg^{2+} . Известно, что связывание второго иона Mg^{2+} с нативным ферментом улучшается в присутствии субстрата. Это справедливо и для Lys115Ala-, и для Arg43Gln-PPase, однако, в случае мутантного варианта с заменой Lys148 на Gln присутствие субстрата практически не влияет на сродство ионов магния к центру M2.

При высоких концентрациях Mg^{2+} (более 2 мМ) наблюдается ингибирование активности нативного фермента (рис. 6) за счет заполнения ионами

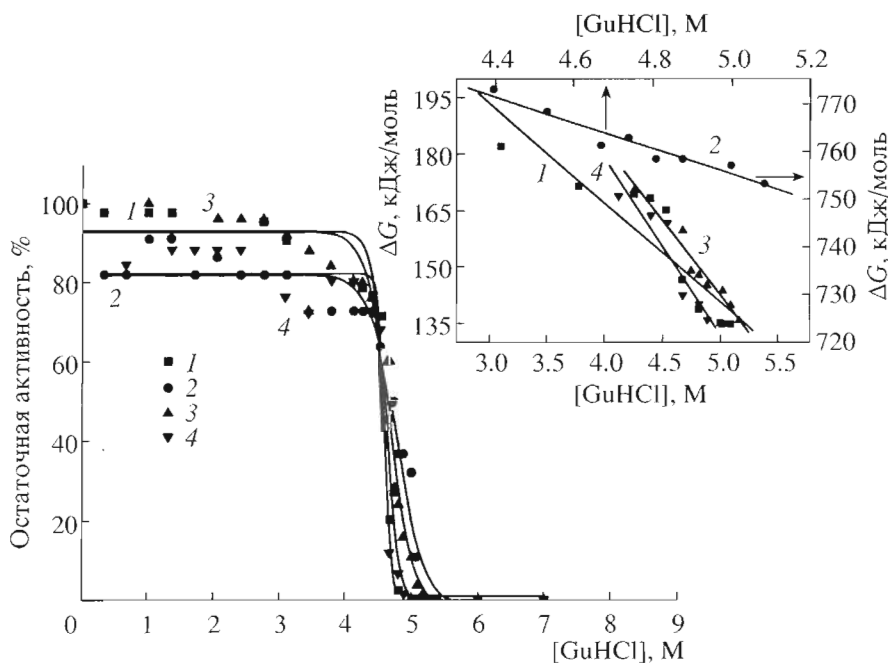


Рис. 5. Остаточная активность нативной PPase (1) и ее мутантных вариантов Arg43Gln (2), Lys115Ala (3) и Lys148Gln (4) после инкубации с GuHCl. Линии построены по уравнению (4) с использованием нелинейной регрессии. На врезке: зависимость величины $\Delta G_{ден}$, рассчитанной как описано в тексте, от концентрации GuHCl. Обозначения прямых как на основном рисунке.

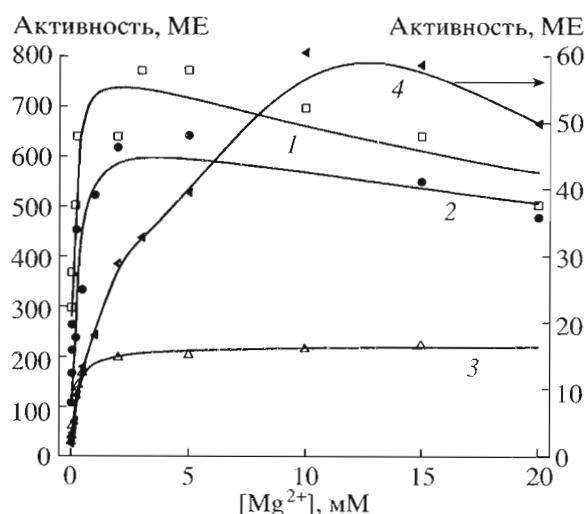


Рис. 6. Зависимость от концентрации Mg^{2+} скорости гидролиза $MgPP_i$ нативной (1) и мутантными PPases: Lys115Ala (2), Lys148Gln (3) и Arg43Gln (4).

Mg^{2+} центра M4 [15]. Аналогичный эффект наблюдается в случае мутантных вариантов Lys115Ala- и Arg43Gln-PPase, но не проявляется для Lys148Gln-PPase в изученном диапазоне концентраций. Таким образом, у Lys148Gln-PPase в присутствии субстрата происходит ухудшение связывания как второго, так и четвертого ионов Mg^{2+} . Четвертый ион Mg^{2+} слабее связывается также и с Arg43Gln-PPase, так как ингибирование гидролиза начинает проявляться при более высоких его концентрациях (рис. 6).

Характеристика олигомерного состояния ферментов

Известно, что нативная PPase диссоциирует при pH 5.3 [16, 17], коэффициент седиментации равен $4.3 \pm 0.1 S$. В то же время Lys115Ala-, Lys148Gln- и Arg43Gln-PPase в этих условиях не диссоциируют и остаются гексамерными формами ($s = 6.2 \pm 0.3 S$). Этот факт подтверждает, что у мутантных ферментов происходят такие изменения структуры, которые усиливают межтримерные контакты и приводят к увеличению прочности всего белка.

Таким образом, в поисках подходов для локализации эффекторного центра в структуре PPase проведена замена аминокислотных остатков, вхо-

дящих в катионный кластер белка. Четко показано, что замена основных аминокислот на нейтральные, действительно, принципиально изменяет свойства эффекторного центра, ослабляя его сродство к PP_i . Хотя катионный кластер расположен на поверхности белковой глобулы, его изменение привело к существенным перестройкам структуры мутантных вариантов ферментов. Этот факт, крайне часто сопровождающий мутагенез, затрудняет однозначную интерпретацию последствий введенных замен, но, к сожалению, часто выпадает из поля зрения исследователей, контролирующих лишь одно из свойств нового белка. Полученные в настоящей работе данные свидетельствуют о функциональной значимости аминокислот, входящих в катионный кластер белка, и не исключают возможности их участия в образовании эффекторного центра, но в то же время справедливость этого утверждения требует дополнительных доказательств. В связи с этим дальнейшее развитие работы направлено на кристаллизацию комплексов фермент-эффектор и последующий их рентгеноструктурный анализ.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Исходные вещества. PPase и ее мутантные варианты получали аналогично описанному ранее [6, 18]. Суспензию фермента хранили в растворе сульфата аммония (90% насыщения) и обессоливали перед использованием на колонке с сефадексом G-50 (fine), уравновешенной 0.05 M Трис-НСI-буфером, pH 7.5.

В работе использовали Трис, MES (Serva, Германия), краситель метиловый зеленый, пирофосфат натрия, метилendisфосфовую кислоту, DEAE-Sephарозе, гуанидингидрохлорид, HEPES (Sigma, США), остальные реагенты отечественного производства квалификации не ниже "х.ч.". Во всех опытах использовали титрованные растворы $MgCl_2$, все растворы готовили на бидистиллированной воде.

Концентрацию растворов PPase определяли спектрофотометрически, используя величину $A_{280}^{1\%} = 11.8$ [19]. Активность ферментов выражена в международных единицах (МЕ) — количество мкмоль субстрата, расщепляемое 1 мг фермента за 1 мин.

Таблица 4. Константы диссоциации (мМ) комплексов Mg^{2+} -фермент и Mg^{2+} -фермент-субстрат для нативной и мутантных PPases

Комплекс	PPase			
	WT	Lys115Ala	Lys148Gln	Arg43Gln
Mg^{2+} -фермент	1.4 ± 0.4	3.7 ± 0.3	1.2 ± 0.1	1.8 ± 0.4
Mg^{2+} -фермент-субстрат	0.3 ± 0.04	0.3 ± 0.04	0.9 ± 0.08	0.5 ± 0.04

Кинетические измерения. Скорость высвобождения фосфата из $MgPP_i$ нативной и мутантными PPases измеряли на полуавтоматическом анализаторе фосфата [20]. Чувствительность прибора составляла 5–10 мкМ фосфата на полную шкалу самописца. При расчете общих концентраций реагентов учитывали все формы, содержащие ионы магния и пирофосфата. Для этого использовались константы диссоциации соответствующих комплексов [21]. Принималось, что величины констант диссоциации для $MgPP_i$ и для $MgPCP$ одинаковы.

При измерении скорости гидролиза $MgPP_i$ реакционная смесь содержала 50 мМ Трис-НСI-буфер, рН 7.5; 2 – 1000 мкМ $MgPP_i$, 2 мМ Mg^{2+} и необходимое количество фермента.

Изучение влияния РСР на скорость гидролиза 10 мкМ $MgPP_i$ проводили в 50 мМ MES-NaOH-буфере, рН 6.0, содержащем 1–100 мкМ свободный РСР и 10 мМ Mg^{2+} .

За связыванием Mg^{2+} в центре M2 в присутствии субстрата следили по изменению скорости гидролиза 50 мкМ $MgPP_i$ в 50 мМ Трис-НСI-буфере, рН 7.5, содержащем Mg^{2+} 0.01–20 мМ.

Связывание Mg^{2+} в центре M4 определяли из зависимости скорости гидролиза 30 мкМ $MgPP_i$ в широком диапазоне концентраций Mg^{2+} 0.01–20 мМ. Измерения проводили в 50 мМ Трис-НСI-буфере, рН 9.0.

Дифференциальная УФ-спектроскопия. Титрование нативной PPase, а также ее мутантных вариантов: Lys115Ala-, Lys148Gln- и Arg43Gln-PPases проводили на спектрофотометре “Ultraspek-300” (Pharmacia Biotech, Швеция). Дифференциальные спектры PPase снимали в диапазоне 230–340 нм. Раствор фермента в 50 мМ Трис-НСI-буфере, рН 9.0 в концентрации 0.3–0.4 мг/мл помещали в кювету (l 1 см), объем реакционной смеси 2 мл. Титрование проводили, добавляя аликвоты $MgCl_2$ 5–6 мкл таким образом, чтобы его концентрация варьировалась в диапазоне 0.01–50 мМ.

Седиментационный анализ. Скоростная седиментация нативной PPase, а также ее мутантных вариантов: Lys115Ala-, Lys148Gln- и Arg43Gln-PPases проводилась при 48000 об/мин, 20°C на аналитической ультрацентрифуге Spinco E и сканировании при 280 нм. Коэффициент седиментации рассчитывали по стандартной методике [22]. Концентрация фермента составляла 5 мкМ.

Дифференциальная сканирующая калориметрия. Калориметрические измерения нативной PPase, а также ее мутантных вариантов: Lys115Ala-, Lys148Gln- и Arg43Gln-PPases проводили в дифференциальном адиабатическом сканирующем калориметре ДАСМ-4 (Биоприбор, РАН, г. Пущино) с капиллярными платиновыми ячейками объемом 0.47 мл. Регистрацию, накопление и обработку данных проводили с помощью программ, раз-

работанных в лаборатории физико-химических методов НИИ им. А.Н. Белозерского, и пакета Origin (MicroCal, США).

Исследования проводили при скорости нагрева 1°C/мин. Измерения проводили при постоянном избыточном давлении 2 атм. Для получения базовой линии сканировали буферный раствор (0.1 М HEPES-NaOH, рН 7.5, 10 мМ Mg^{2+}). Повторный прогрев образцов показал необратимую денатурацию всех исследуемых ферментов.

Перед измерением белки обессоливали гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-50 (fine), уравновешенной 0.1 М HEPES-NaOH, рН 7.5.

Химическая денатурация. Каждая реакционная смесь объемом 60 мкл содержала 50 мМ Трис-НСI-буфер, рН 7.5, $GnHCl$ требуемой концентрации (0–8 М) и 5 мкМ фермент. Реакционные смеси инкубировали в течение 20–24 ч при температуре 20–25°C, после чего измеряли ферментативную активность по гидролизу 50 мкМ субстрата в присутствии 1 мМ Mg^{2+} . Для расчета энергии денатурации ферментативная активность была нормирована к исходной активности соответствующего фермента в отсутствие денатурирующего агента. Зависимость активности от концентрации $GnHCl$ обрабатывали по уравнению [9, 23]:

$$\alpha = \alpha_0 + \frac{Ax^h}{[GnHCl]_{1/2}^h + x^h} \quad (4)$$

где α – доля неденатурированных молекул в смеси, за которую в данном случае принимали остаточную активность фермента; α_0 – уровень остаточной активности при высокой концентрации $GnHCl$; A – максимальное изменение активности; h – коэффициент, определяющий кооперативность перехода; x – концентрация $GnHCl$; $[GnHCl]_{1/2}$ – концентрация $GnHCl$, при которой остаточная активность фермента составляет 1/2 от исходной. При каждой концентрации $GnHCl$ рассчитывали значение $\Delta G_{ден}(x)$ и далее из зависимости $\Delta G_{ден}(x)$ от $[GnHCl]$ методом линейной регрессии определяли свободную энергию денатурации $\Delta G_{ден}(H_2O)$.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарны сотрудникам отдела химии белка Института физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского за активную поддержку и плодотворное обсуждение полученных результатов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты № 03-04-48866 и 03-04-06150 “Молодые ученые, аспиранты, студенты”); гранта № НШ-1706-2003-4 Президента РФ для поддержки ведущих научных школ Российской Федерации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Harutyunyan E.H., Lamzin V.S., Dauter Z., Teplyakov A.V., Wilson K.S. // *Eur. J. Biochem.* 1996. V. 239. P. 220–228.
2. Avaeva S.M., Grigorjeva O., Mitkevich V., Sklyankina V.A., Varfolomeev S. // *FEBS Lett.* 1999. V. 464. P. 169–173.
3. Sitnik T.S., Vainonen J.P., Rodina E.V., Nazarova T.I., Kurilova S.A., Vorobyeva N.N., Avaeva S.M. // *IUBMB Life.* 2003. V. 55. P. 37–41.
4. Вайнонен Ю.П., Воробьева Н.Н., Родина Е.В., Назарова Т.И., Курилова С.А., Скоблов Ю.С., Аваева С.М. // *Биохимия.* 2005. Т. 60. С. 85–90.
5. Samygina V.R., Popov A.N., Rodina E.V., Vorobyeva N.N., Lamzin V.S., Polyakov K.M., Kurilova S.A., Nazarova T.I., Avaeva S.M. // *J. Mol. Biol.* 2001. V. 314. P. 633–645.
6. 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.
7. Avaeva S.M., Rodina E.V., Kurilova S.A., Nazarova T.I., Vorobyeva N.N. // *FEBS Lett.* 1996. V. 392. P. 91–94.
8. Privalov P.L. // *Adv. Prot. Chem.* 1979. V. 33. P. 167–241.
9. Pace C.N. // *Methods Enzymol.* 1986. V. 131. P. 266–279.
10. Hansen T., Urbanke C., Leppänen V.-M., Goldman A., Brandenburg K., Schäfer G. // *Archives of Biochem. and Biophys.* 1999. V. 363. P. 135–147.
11. Myers J.K., Pace C.N., Scholtz J.M. // *Prot. Sci.* 1995. V. 4. P. 2138–2148.
12. Salminen T., Kapyla J., Heikinheimo P., Kankare J., Goldman A., Hainonen J., Baykov A., Cooperman B., Lahti R. // *Biochemistry.* 1995. V. 34. P. 782–791.
13. Аваева С.М., Родина Е.В., Воробьева Н.Н., Курилова С.А., Назарова Т.И., Склянкина В.А., Оганесян В.Ю., Самыгина В.Р., Арутюнян Э.Г. // *Биохимия.* 1998. Т. 63. С. 797–811.
14. Satherland G.R.J., Aust S.D. // *Biochemistry.* 1997. V. 36. P. 8567–8573.
15. Rodina E.V., Vainonen Yu.P., Vorobyeva N.N., Kurilova S.A., Nazarova T.I., Avaeva S.M. // *Eur. J. Biochem.* 2001. V. 268. P. 3851–3857.
16. Вайнонен Ю.П., Курилова С.А., Аваева С.М. // *Биоорган. химия.* 2002. Т. 28. С. 426–433.
17. Борщик И.Б., Склянкина В.А., Аваева С.М. // *Биохимия.* 1986. Т. 51. С. 1607–1611.
18. Avaeva S., Ignatov P., Kurilova S., Nazarova T., Rodina E., Vorobyeva N., Oganessyan V., Harutyunyan E. // *FEBS Lett.* 1996. V. 399. P. 99–102.
19. Josse J. // *J. Biol. Chem.* 1966. V. 241. P. 1938–1947.
20. Baykov A.A., Avaeva S.M. // *Anal. Biochem.* 1981. V. 116. P. 1–4.
21. Шафранский Ю.А., Байков А.А., Андрукович П.Ф., Аваева С.М. // *Биохимия.* 1977. Т. 42. С. 1244–1254.
22. Chervenka C.H. *Methods for Analytical Ultracentrifuge.* Spinco Division of Beckman Instruments Inc. Palo Alto, 1972.
23. Tanford C. // *Adv. Prot. Chem.* 1970. V. 24. P. 1–95.

A Cationic Cluster of Amino Acid Residues of Inorganic Pyrophosphatase from *Escherichia coli* as a Possible Site of Effector Binding

T. S. Sitnik*# and S. M. Avaeva**

Phone: +7 (095) 939-5362; fax: +7 (095) 939-3181; e-mail: tatiy@mail.ru

*Faculty of Chemistry, Moscow State University,
Vorob'evy gory, Moscow, 119899 Russia

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

A computer-assisted analysis of the molecule of *Escherichia coli* pyrophosphatase was earlier used to localize the site capable of binding free pyrophosphate or methylene diphosphonate, a PP_i analogue, and thereby activating the enzyme. A cluster of positively charged amino acid residues (Lys146, Lys148, Lys115, and Arg43) was revealed, and Lys115Ala, Lys148Gln, and Arg43Gln mutant pyrophosphatases (PPases) were obtained. It was shown that the kinetics of hydrolysis of the magnesium pyrophosphate (MgPP_i) substrate by these mutant variants does not obey the Michaelis–Menten equation, which is expressed in two slopes in the double-reciprocal plot of the enzyme reaction rate vs. substrate concentration. The two regions on the curves correspond to the ranges of high and low MgPP_i concentrations. This suggests that, in all mutant variants of the enzyme, the binding of PP_i at the effector site becomes worse, whereas the affinity of MgPP_i for the active site remains practically unchanged. Other properties of the enzymes, such as its oligomeric state, resistance to thermal denaturation, and resistance to the denaturing agent guanidine hydrochloride, were thoroughly studied. The constants of binding of Mg²⁺ to mutant enzymes in the absence of the substrate and to enzyme–substrate complexes were determined. The introduction of amino acid substitutions was shown to stabilize the protein globule. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2005, vol. 31, no. 3; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: inorganic pyrophosphatase, mutant variants, effector site