



УДК 577.153.35

ПОЛУЧЕНИЕ ИММОБИЛИЗОВАННОГО ДИМЕРА И МОНОМЕРА  
НЕОРГАНИЧЕСКОЙ ПИРОФОСФАТАЗЫ И ДОКАЗАТЕЛЬСТВО  
КАТАЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ СУБЪЕДИНИЦЫ

Плаксина Е. А., Сергиенко О. В., Склянкина В. А.,  
Абаева С. М.

*Межфакультетская проблемная лаборатория молекулярной биологии  
и биоорганической химии им. А. Н. Белозерского и химический факультет МГУ*

Двумя способами получена «одноточечно» иммобилизованная неорганическая пирофосфатаза из пекарских дрожжей. Исследована ее стабильность при различных рН. Определены субстратная специфичность и рН-оптимум действия иммобилизованного димера. Получена иммобилизованная субъединица пирофосфатазы диссоциацией иммобилизованного димера при рН 10,5. Установлен факт каталитической активности субъединицы неорганической пирофосфатазы.

Выяснение значения субъединичных взаимодействий для проявления каталитической активности представляет собой один из аспектов изучения механизма действия олигомерных ферментов. В ферментах, молекулы которых состоят из двух идентичных субъединиц, возможно наличие одного активного центра, двух активных центров, действующих поочередно, либо двух независимых активных центров. В первом и во втором случаях для функционирования фермента необходима четвертичная структура. Для большого числа олигомерных ферментов, содержащих независимые активные центры, также установлен факт взаимного влияния субъединиц, что выражается в проявлении кооперативности при связывании с субстратами, активаторами, ингибиторами и т. д. (например, [1-3]). Таким образом, изучение роли четвертичной структуры необходимо для понимания механизма действия олигомерных ферментов.

Экспериментальным подходом, дающим информацию о роли субъединичных взаимодействий, является определение ферментативной активности индивидуальных субъединиц. До недавнего времени такого рода исследования представляли трудноразрешимую задачу, поскольку применяемая обычно для получения субъединиц обработка белка агентами, вызывающими диссоциацию (мочевинной, гуанидинхлоридом, растворами с высокими или низкими значениями рН), нарушает третичную и вторичную структуру белка. Удаление из реакционной смеси агентов, вызывающих диссоциацию, как правило, приводит к реконструкции олигомера.

Значительный прогресс в исследовании индивидуальных субъединиц олигомерных ферментов наметился в последние годы благодаря работам Чана [4-6]. Метод Чана заключается в ковалентном связывании олиго-

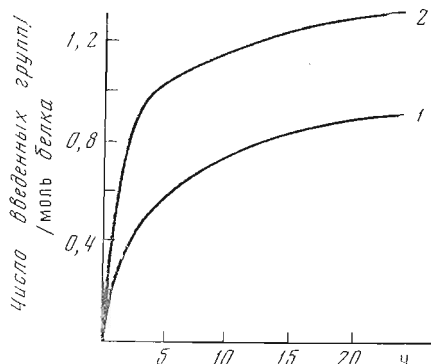


Рис. 1. Модификация цистеиновых остатков неорганической пирофосфатазы 4,4'-динитрилдисульфидом в отсутствие (1) и в присутствии (2) 1 мМ EDTA

ляет собой димер, состоящий из двух химически идентичных субъединиц. Его молекула содержит два активных центра. Этот вывод сделан на основании данных по равновесному диализу, из которых следует, что 1 моль белка связывает 2 моль аналога субстрата — пирофосфата кальция [7]. В то же время в ряде реакций пирофосфатаза проявляет вполнину большую реакционную способность. Так, фосфорилирование фермента неорганическим фосфатом [8], реакция с *O*-метилгидроксиламином и метиловым эфиром глицина [9], модификации сульфгидрильных групп не идут более чем на 50%. Изучение взаимодействия неорганической пирофосфатазы с аффинным реагентом *O*-фосфотаноламином показало неидентичное поведение субъединиц фермента [10].

В настоящее время отсутствуют данные о функциональной роли субъединиц и имеются лишь косвенные указания на каталитическую активность мономера пирофосфатазы [11].

Цель данной работы — исследование каталитической активности индивидуальной субъединицы неорганической пирофосфатазы. Для этого двумя способами была получена «одноточечно» иммобилизованная пирофосфатаза, проведена ее диссоциация и охарактеризован иммобилизованный мономер.

Для получения иммобилизованного фермента, связанного с матрицей только за одну из субъединиц, использованы два подхода. Первый заключается в ковалентном присоединении фермента по аминогруппе лизина к сефарозе, активированной бромцианом [12], с наибольшим содержанием активных групп. Для иммобилизации использовали белок с высокой удельной активностью (650 МЕ/мг). При выборе условий иммобилизации исходили из следующих соображений. В молекуле неорганической пирофосфатазы содержится 56 остатков лизина [13], причем два из них существенны для проявления ферментативной активности. Функционально важные остатки лизина не затрагиваются, если проводить модификацию в присутствии субстрата — неорганического пирофосфата. Неорганический ортофосфат также защищает от инактивации, хотя и менее эффективно.

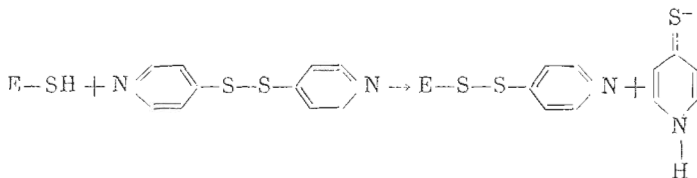
Анализ показал, что при проведении иммобилизации фермента в выбранных условиях (см. «Экспериментальную часть») концентрация белка на смоле составляет 50 мкг/мл геля, а его удельная активность — 450 МЕ/мг белка. Таким образом, была получена иммобилизованная неорганическая пирофосфатаза с высокой удельной активностью, составляющей 70% активности исходного нативного фермента.

мерного фермента с жесткой матрицей только за одну из субъединиц, в обработке фермента, фиксированного на носителе, диссоциирующими агентами, и удалении субъединиц, не связанных с матрицей ковалентно. Удаление диссоциирующих агентов приводит к восстановлению вторичной и третичной структуры субъединицы, связанной с матрицей. Таким образом, представляется возможность установить каталитическую активность этой субъединицы.

Объектом исследования настоящей работы является неорганическая пирофосфатаза из пекарских дрожжей (КФ 3.6.1.1), катализирующая в присутствии ионов двухвалентных металлов гидролиз пирофосфорной кислоты и ее моноэфиров. Фермент представ-

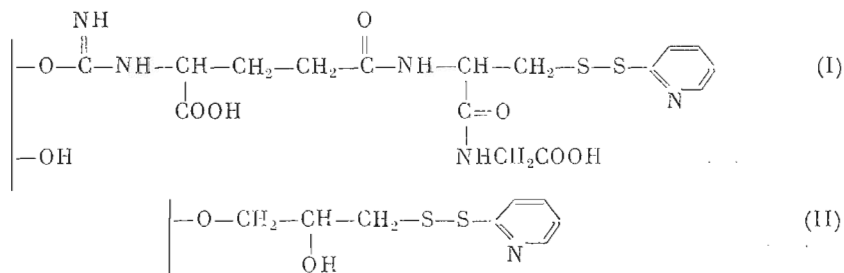
Второй подход получения «одноточечно» связанного фермента основан на создании дисульфидной связи между ферментом и матрицей.

Молекула неорганической пирофосфатазы содержит два остатка цистеина (по одному на каждую субъединицу), различающиеся по своей реакционной способности [14]. В специально поставленных опытах была исследована реакционная способность цистеиновых остатков белка по отношению к 4,4'-дипиридилдисульфиду



За сутки в пирофосфатазе блокируется 0,9—1,05 цистеиновых остатков (рис. 1). Скорость модификации возрастает при добавлении EDTA. Реакция в данном случае имеет двухстадийный характер. В течение 3 ч происходит модификация одного цистеинового остатка. Более длительное выдерживание фермента с реагентом приводит к вовлечению в реакцию второй сульфгидрильной группы белка. Однако этот процесс протекает очень медленно, и в течение 20 ч в ферменте модифицируется дополнительно только 0,3 цистеинового остатка. Существенно, что при модификации одной сульфгидрильной группы пирофосфатазы практически полностью сохраняется ферментативная активность (90%).

Для иммобилизации пирофосфатазы через сульфгидрильную группу матрицей служили тиолированные производные сефарозы (тиолсефарозы): глутатион-сефароза (I) и 3-тио-2-оксипропил-сефароза (II), активированные 2,2'-дипиридилдисульфидом. Содержание активированных групп составило в них соответственно 1 и 40 мкмоль на 1 мл отстоявшегося геля.



Было установлено, что количество иммобилизованного фермента определяется величиной pH раствора, количеством активированных групп на матрице и концентрацией белка в реакционной смеси. Так, с ростом pH от 7,2 до 8,0 степень иммобилизации увеличивается в 6 раз. Проведение иммобилизации при более высоких значениях pH казалось нецелесообразным в связи с опасностью денатурации фермента при используемых низких его концентрациях. Препараты неорганической пирофосфатазы, иммобилизованной на глутатионсефарозе, характеризовались довольно небольшим содержанием фермента (1,2 МЕ/мл), что является следствием низкой концентрации лиганда. При проведении иммобилизации на 3-тио-2-оксипропилсефарозе, активированной 2,2'-дипиридилдисульфидом, в условиях, аналогичных опытам с глутатионсефарозой, была получена иммобилизованная пирофосфатаза с активностью 15,6 Е/мл. Дальнейшие исследования по иммобилизации проводили с тимоксипропилсефарозой.

Установлено, что с увеличением концентрации белка в реакционной смеси возрастает и степень иммобилизации. Так, при увеличении концен-

Таблица 1

**Иммобилизация неорганической пирофосфатазы  
на активированной 3-тио-2-оксипропилесфарозе**  
рН 8,0; 1 мМ EDTA; 3 ч

Концентрация белка в реакционной смеси, мкг/мл	Количество белка, присоединенного к матрице, мкг/мл	Удельная активность иммобилизованного фермента, МЕ/кг белка	Остаточная активность, %
42,5	19,5	177	38
180	46,4	225	39
365	138	193	39
600	242	120	25
1120	657	76	14
2330	2300	34	6

Таблица 2

**Содержание белка и ферментативная активность  
иммобилизованных производных пирофосфатазы**

Препарат	Содержание белка, мкг	Активность, %	Удельная активность, %	
			МЕ/мг белка	%
SH-Иммобилизованный димер	185	100	90	100
SH-Иммобилизованный мономер	95	34	65	70
NH <sub>2</sub> -Иммобилизованный димер	48	100	450	100
NH <sub>2</sub> -Иммобилизованный мономер	24	25	225	50

трации белка в 55 раз количество иммобилизованного фермента увеличивается в 120 раз (табл. 1).

Существенно, что процесс увеличения степени иммобилизации сопровождается падением удельной активности иммобилизованного фермента (табл. 1). Этот факт можно объяснить увеличением белок-белкового взаимодействия с ростом содержания фермента на матрице. Следует отметить довольно низкую удельную активность препаратов SH-иммобилизованной пирофосфатазы. Это может быть связано либо с частичной денатурацией белка при его иммобилизации, либо со стерическими затруднениями и диффузионными ограничениями при взаимодействии с субстратом. Экспериментальной проверкой, дающей возможность сделать выбор между этими предположениями, явилось определение ферментативной активности белка после его снятия с матрицы. Иммобилизованный фермент с удельной активностью 84 МЕ/мл инкубировали в 20 мМ дитиозеритрите в течение суток, отделяли фермент от SH-реагентов и определяли удельную активность пирофосфатазы, перешедшей в раствор. Удельная активность составила 266 МЕ/мг, т. е. превышала активность иммобилизованного белка в 3 раза. Следовательно, основной вклад в уменьшение пирофосфатазной активности вносят стерические и диффузионные затруднения, возникающие в результате иммобилизации фермента.

Для иммобилизованной обоими способами неорганической пирофосфатазы исследована стабильность при различных рН и определены субстратная специфичность и рН-оптимум действия. Как видно из приведенных данных (рис. 2), при рН 4,0—8,0 устойчивость нативного и NH<sub>2</sub>-иммобилизованного фермента практически одинакова, а при рН > 8,0 иммобилизованный фермент характеризуется большей стабильностью. Профиль рН-стабильности SH-иммобилизованного фермента аналогичен кривой, полученной для NH<sub>2</sub>-иммобилизованной пирофосфатазы.

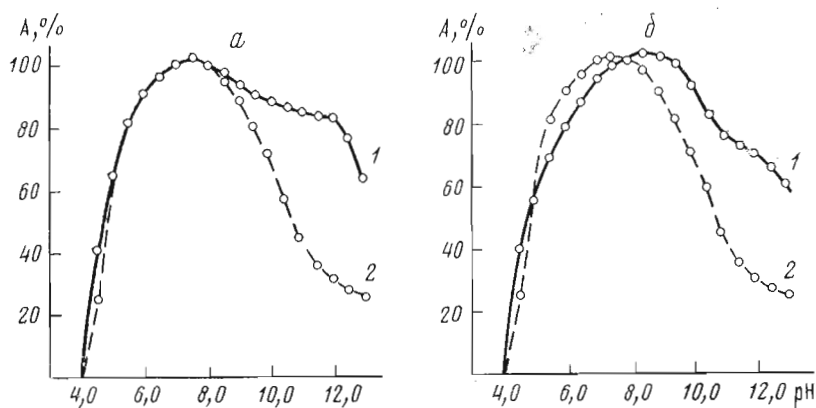


Рис. 2. Зависимость устойчивости иммобилизованной (1) и нативной (2) неорганической пирофосфатазы от pH (1 ч, 25° С): а — SH-иммобилизация, б — NH<sub>2</sub>-иммобилизация

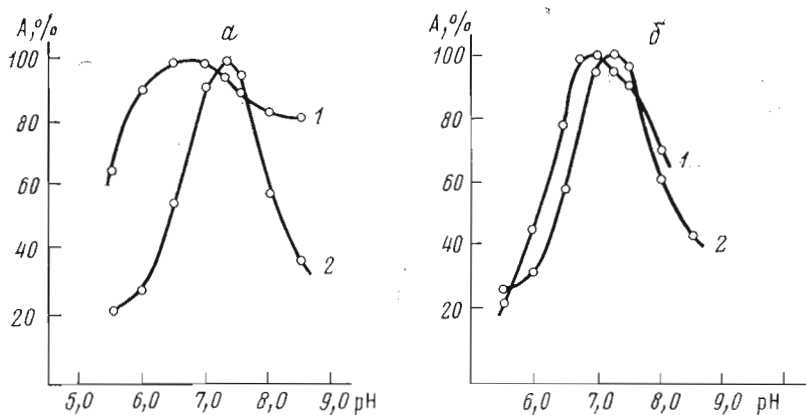


Рис. 3. Ферментативная активность иммобилизованной (1) и нативной (2) неорганической пирофосфатазы при различных pH. а — SH-иммобилизация, б — NH<sub>2</sub>-иммобилизация

Представленные на рис. 3 данные свидетельствуют, что для обоих образцов иммобилизованной пирофосфатазы наблюдается сдвиг оптимума действия в кислую область по сравнению с нативным ферментом. Кроме того, кривая зависимости ферментативной активности от pH для иммобилизованного фермента имеет более пологий характер. Похожая кривая была получена ранее для многоточечно NH<sub>2</sub>-иммобилизованной пирофосфатазы [15].

Известно, что многоточечно иммобилизованная пирофосфатаза, полученная присоединением фермента к сефарозе, активированной бромцианом, полностью утрачивает АТФ-азную активность [15]. В настоящей работе установлено, что фермент, иммобилизованный через цистеиновые остатки, гидролизует АТФ. pH-Оптимумы гидролиза АТФ для иммобилизованного и нативного фермента совпадают.

Иммобилизованная пирофосфатаза была использована для получения индивидуальных субъединиц фермента.

Ранее нами были разработаны условия диссоциации неорганической пирофосфатазы с полным сохранением ее ферментативной активности [11]. Было показано, что при выдерживании нативного фермента при pH 10,5 либо в 4 или 6 М хлоридате гуанидина в течение суток происходит полная диссоциация белка. Об этом свидетельствуют данные по уменьшению коэффициента седиментации с 4,3 до 2,8S, а также умень-

шение молекулярного веса с 68 000 до 38 000 (определено методами седиментационного анализа и равновесного центрифугирования).

Для получения иммобилизованной субъединицы фермента препараты иммобилизованного димера инкубировали в 0,5 М глициновом буфере, рН 10,5, в течение суток при комнатной температуре, т. е. в условиях полной диссоциации фермента, и определяли количество белка и пирофосфатазную активность в растворе и на смоле. Для определения количества иммобилизованного белка проводили полный кислотный гидролиз аликвоты геля и количество присоединенного фермента рассчитывали с помощью аминокислотного анализатора. Во всех случаях в качестве контроля использовали образец чистой сефарозы, прошедшей те же обработки, что и иммобилизованный фермент (табл. 2).

Принципиально важным результатом, полученным в данной работе, является установление факта пирофосфатазной активности мономера неорганической пирофосфатазы.

Как видно из табл. 2, содержание связанного белка после инкубации препарата при рН 10,5 в обоих препаратах иммобилизованного фермента уменьшается вдвое, что свидетельствует о полноте диссоциации. В то же время гель проявляет 34% остаточной ферментативной активности в случае SH-иммобилизованного фермента и 25% в случае NH<sub>2</sub>-иммобилизованного фермента, что и является доказательством каталитической активности субъединицы неорганической пирофосфатазы. В настоящее время трудно объяснить, почему удельная активность субъединицы ниже удельной активности димера пирофосфатазы. Это может быть связано либо с частичной денатурацией субъединицы из-за ее более низкой стабильности в условиях диссоциации, либо с ухудшением ее каталитических свойств по сравнению с функционированием в составе димера фермента.

#### Экспериментальная часть

В работе использовали сефарозу 4В (Pharmacia, Швеция) и бромциан (Pharmacia, Швеция). Неорганическую пирофосфатазу выделяли из маточных пекарских дрожжей отечественного производства. Удельная активность фермента 600–650 МЕ/мг.

Тиолсефарозы: глутатионсефароза 4В, активированная 2,2'-дипиридилдисульфидом (1 мкмоль/мл геля) — препарат фирмы «Serva» (ФРГ); тиопропилсефароза 4В, активированная 2,2'-дипиридилдисульфидом (40 мкмоль/мл геля), любезно предоставлена д-ром хим. н. А. Е. Васильевым. 4,4'-Дипиридилдисульфид — препарат фирмы «Pharmacia» (Швеция).

Концентрацию фермента определяли спектрофотометрически, считая, что при концентрации белка 1 мг/мл раствор имеет величину поглощения 1,45 при 280 нм [16]. Ферментативную активность определяли при 25°С по скорости образования неорганического фосфата в растворе, содержащем 1,7 мМ пирофосфат натрия, 1,7 мМ сульфат магния (0,03 М трис-НСl-буфер, рН 7,2). Количество неорганического ортофосфата определяли как в работе [17].

*Иммобилизация неорганической пирофосфатазы на BrCN-активированной сефарозе (NH<sub>2</sub>-иммобилизация).* BrCN-активированную сефарозу, полученную по методу Пората [12] из расчета ~5 мг BrCN на 1 мл отстоявшегося геля, отфильтровывали, промывали в течение 2 мин холодной водой и прибавляли к раствору 10–20 мг фермента в 10–20 мл 0,1 М фосфатного буфера, рН 8,0. Иммобилизацию фермента проводили 18 ч при 4°С. Сефарозу с иммобилизованным белком отфильтровывали, промывали последовательно 50-кратным объемом 0,5 М NaCl в 0,1 М фосфатном буфере, 0,1 М фосфатным буфером и 0,05 М трис-НСl-буфером, рН 7,2, до отсутствия в промывных водах поглощения при 280 нм и ферментативной активности.

*Модификация неорганической пирофосфатазы 4,4'-дипиридилдисульфидом (рис. 1).* К 2 мл раствора белка (0,7–0,9 мг/мл) в 0,1 М трис-НСl-

буфере добавляли 0,3–0,4 мл 1 М раствора 4,4'-дипиридилдисульфида и реакционную смесь инкубировали при 25°С в течение 0–24 ч. Контроль за ходом реакции осуществляли по количеству выделяющегося в ходе реакции 4-тиопиридона, считая, что  $\epsilon_{325}$  тиоаниона составляет  $19\,800\text{ М}^{-1}\text{ см}^{-1}$  [18]. Параллельно периодически определяли активность фермента.

Аналогично проводили модификацию в присутствии 0,8–1,2 мМ EDTA.

*Иммобилизация неорганической пирофосфатазы на тиолсефарозах (SH-иммобилизация).* Неорганическую пирофосфатазу (85–4820 мкг/мл) в 0,2 М трис-НСl-буфере, рН 7,0–8,0, содержащем 2 мМ EDTA и 0,3 М NaCl, добавляли к равному объему геля активированной сефарозы и смесь перемешивали 3–3,5 ч. Иммобилизованный фермент отфильтровывали и тщательно промывали на фильтре 0,2 М трис-НСl, содержащем 0,3 М NaCl и 2 мМ EDTA. Определяли количество пирофосфатазы, присоединенной к носителю, и ее ферментативную активность.

*Определение количества иммобилизованного белка.* Для определения концентрации белка на сефарозе 1 мл отстоявшегося геля (или 0,7 г отжатой смолы) подвергали полному кислотному гидролизу (6 н. HCl, 105°С, 72 ч). Состав гидролизата исследовали на аминокислотном анализаторе. Количество белка рассчитывали по содержанию Glu, Asp, Ala, Val. В качестве контроля использовали соответствующие образцы активированных сефароз, прошедших все те обработки, которым подвергался иммобилизованный белок.

*Определение активности иммобилизованной пирофосфатазы.* Хорошо отстоявшийся сефарозный гель суспендировали в 4-кратном объеме 0,05 М трис-НСl-буфера, рН 7,2. Аликвоту суспензии смолы (0,2 мл) вносили в 5 мл 0,04 М трис-НСl-буфера, содержащего 1,7 мМ сульфат магния. Реакцию начинали добавлением 1 мл 10 мМ пирофосфата натрия, останавливали 1 мл 5% раствора молибдата аммония в 4 н. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и определяли количество ортофосфата.

*Снятие неорганической пирофосфатазы с носителя.* Иммобилизованный фермент переводили в растворимое состояние 20 мМ раствором дитиозритрита в 4 М гуанидинхлориде. Иммобилизованный фермент (0,9 мг белка с удельной активностью 84 МЕ/мг) инкубировали при комнатной температуре в 2 мл 4 М гуанидинхлорида, содержащего дитиозритрит. Сефарозу отфильтровывали и промывали. Фильтрат пропускали через колонку с сефадексом G-50 для удаления 4-тиопиридона и определяли концентрацию белка в растворе и его удельную активность. Они составили соответственно 0,83 мг и 266 МЕ.

*рН-Стабильность иммобилизованной пирофосфатазы.* 0,2 мл суспензии иммобилизованного фермента (7 мкг белка) в трис-НСl-буфере, рН 7,2, инкубировали в 1 мл соответствующего буфера, рН 4,0–12,5, при 25°С в течение 1 ч при тщательном перемешивании и определяли ферментативную активность. Параллельно в аналогичных условиях выдерживали нативный фермент (11 мкг).

*рН-Зависимость пирофосфатазной активности иммобилизованного фермента.* 0,5 мл суспензии иммобилизованного фермента, содержащей 3,3 мкг белка, прибавляли к 5 мл трис-малеатного буфера с соответствующим значением рН, содержащего 2 мМ сульфат магния. Реакцию начинали добавлением 1 мл 10 мМ пирофосфата натрия, через 5 мин останавливали и определяли количество ортофосфата.

*Определение АТФ-азной активности иммобилизованного фермента.* 1 мл геля, содержащего 66 мкг иммобилизованного фермента, суспендировали в 1,9 мл 0,025 М трис-НСl-буфера, рН 7,2. 0,5 мл суспензии иммобилизованного фермента (16,4 мкг белка) прибавляли к 4,2 мл трис-малеат-буфера (рН 6,0–8,0), содержащего 2 мМ ZnCl<sub>2</sub>. Ферментативную реакцию начинали добавлением 0,4 мл 10 мМ раствора АТФ и через 30 мин реакцию останавливали как описано выше.

*Получение иммобилизованной субъединицы неорганической пирофос-*

фатазы. К 1–5 мл геля  $\text{NH}_2$ - или SH-иммобилизованной пирофосфатазы прибавляли равный объем буфера 1 М глицин – NaOH, pH 10,5, и выдерживали смесь в течение 1 сут при 20°С. Гель отфильтровывали, промывали 0,5 М NaCl в буфере 0,5 М глицин – NaOH, pH 10,5, затем буфером 0,5 М глицин – NaOH, pH 10,5, и 0,05 М трис-HCl-буфером, pH 7,2. Определяли содержание белка и пирофосфатазную активность иммобилизованной субъединицы и белка, находящегося в растворе.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Danenberg K. D., Danenberg P. G. (1979) *J. Biol. Chem.*, **254**, 4345–4348.
2. Zinoviev V. V., Rubtsova N. G., Lavrik O. I., Malygin E. G. (1977) *FEBS Lett.*, **82**, 130–134.
3. Malhotra O. P., Srinivasan, Srivastava D. K. (1978) *Biochem. et biophys. acta.* **526**, 1–12.
4. Chan W. W.-C. (1970) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **41**, 1198–1204.
5. Chan W. W.-C. (1973) *Eur. J. Biochem.*, **40**, 533–544.
6. Chan W. W.-C. (1976) *Can. J. Biochem.*, **54**, 521–528.
7. Braga E. A., Avaeva S. M. (1972) *FEBS Lett.*, **27**, 251–255.
8. Назарова Т. И., Аваева С. М. (1973) *Биохимия*, **38**, 169–173.
9. Финк Н. Ю., Назарова Т. И., Аваева С. М. (1975) *Химия природн. соедин.*, **2**, 235–240.
10. Кузнецов А. В., Скляцкина В. А., Аваева С. М. (1979) *Биоорган. химия*, **5**, 1396–1403.
11. Аваева С. М., Плаксина Е. А., Скляцкина В. А. (1979) *Биохимия*, **44**, 1080–1083.
12. Porath J., Aspberg K., Drevin H., Axen R. (1973) *J. Chromatogr.*, **86**, 53–56.
13. Cohen S. A., Sterner R., Keim P. S., Heinrichson L. (1978) *J. Biol. Chem.*, **253**, 889–896.
14. Шафранский Ю. А., Аваева С. М., Котельников А. И. (1975) *Биоорган. химия*, **1**, 203–207.
15. Плаксина Е. А., Скляцкина В. А., Мевх А. Т., Аваева С. М. (1975) *Биоорган. химия*, **1**, 555–562.
16. Kunitz M. (1952) *J. Gen. Physiol.*, **35**, 423–432.
17. Weil-Malherbe H., Green R. (1951) *Biochem. J.*, **49**, 286–292.
18. Grasseti D. R., Murray J. F. (1967) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **119**, 44–49.

Поступила в редакцию

20.III.1980

После доработки

19.IX.1980

#### PREPARATION OF IMMOBILIZED DIMER AND MONOMER OF INORGANIC PYROPHOSPHATASE AND EVIDENCE FOR SUBUNIT CATALYTIC ACTIVITY

PLAKSINA E. A., SERGIENKO O. V., SKLYANKINA V. A., AVAEVA S. M.

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

Two methods have been used to obtain a «single-point» immobilized inorganic pyrophosphatase from baker's yeast. The stability of this preparation was studied at different pH. The substrate specificity and pH-optimum were determined for the immobilized enzyme. An immobilized subunit of pyrophosphatase was obtained by dissociation of immobilized dimer at pH 10,5. The fact of the catalytic activity of inorganic pyrophosphatase subunit was established.