



УДК 577.153.35.02

ИЗМЕНЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ
НЕОРГАНИЧЕСКОЙ ПИРОФOSФАТАЗЫ ДРОЖЖЕЙ
ПРИ МОДИФИКАЦИИ SH-ГРУПП*Байков А. А., Граснова В. И., Аваева С. М.**Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
Межфакультетская проблемная научно-исследовательская лаборатория
молекулярной биологии и биоорганической химии им. А. Н. Белозерского*

Иод, $HgCl_2$ и *n*-оксимеркурибензоат уменьшают в 2 раза максимальную скорость гидролиза $Mg-PP_i$ неорганической пирофосфатазой и в 5–8 раз ее фосфорилирование и синтез связанного с белком PP_i . Инактивация фермента иодом коррелирует с окислением двух SH-групп на димер. SH-группы не реагируют с *N*-этилмалеймидом и 5,5'-дитиобис(2-нитробензоатом). Результаты показывают, что остатки цистеина пирофосфатазы обладают пониженной реакционной способностью и не принимают непосредственного участия в катализе, хотя их модификация сильно влияет на каталитический акт.

Молекула неорганической пирофосфатазы (КФ 3.6.1.1) из пекарских дрожжей состоит из двух одинаковых субъединиц, каждая из которых имеет в своем составе один остаток цистеина [1, 2]. Сообщалось, что гидролитическая активность фермента не уменьшается под действием ряда SH-реагентов [3–7], поэтому был сделан вывод, что его SH-группы не участвуют в катализе. Надо, однако, отметить, что модификация SH-групп происходила не полностью [4, 6–8]. С другой стороны, известно, что разрушение третичной структуры пирофосфатазы, как и ряда других белков, увеличивает реакционную способность SH-групп [2]. Поскольку пирофосфатаза, использованная в некоторых работах [4, 8], была получена методом, который приводит к частичной деструкции белка [9], можно предположить, что наблюдавшаяся частичная модификация связана с присутствием денатурированного белка, тогда как в нативном белке SH-группы полностью недоступны для использованных реагентов. В таком случае вывод о неучастии остатков цистеина в катализе оказывается недостаточно обоснованным. Для его проверки в настоящей работе был предпринят поиск реагентов и условий, которые обеспечивают полную модификацию SH-групп нативной пирофосфатазы. Для получения фермента был использован метод, дающий препараты с максимальной удельной активностью [10] и, следовательно, наилучшим образом сохраняющий нативную структуру белка.

В предварительных экспериментах мы обнаружили, что активность пирофосфатазы заметно снижается в присутствии ионов тяжелых металлов, в частности двухвалентной ртути, которые, как известно, прочно связываются сульфгидрильными группами белков. Этот эффект, однако, не всегда воспроизводился. Было обнаружено, что он в значительной степени зависит от природы и концентрации буфера и соотношения концентраций $MgCl_2$ и PP_i . Ингибирование под действием 10^{-5} М $HgCl_2$ наблюдалось в присутствии 0,05 М буфера трис-HCl (pH 7,2), 2 мМ $MgCl_2$ и 1 мМ PP_i . При двукратном увеличении концентрации буфера или уменьшении концентрации металла-активатора этот эффект исчезал. Повидимому, содержание ионов Hg^{2+} при этом сильно уменьшалось за счет комплексообразования с компонентами буфера и свободным ионом PP_i .

Дальнейшие эксперименты с ртутными соединениями проводили в буфере, слабо комплексуемом ионы металлов [11] (см. «Экспериментальную часть»), в присутствии избытка $MgCl_2$. В этих условиях $HgCl_2$ и *n*-оксимеркурибензоат снижали активность пирофосфатазы вдвое (табл. 1).

Таблица 1

Влияние SH-реагентов на активность пирофосфатазы.
Цифры в скобках относятся к мономерной форме фермента

Ингибитор	Концентрация, мМ	Остаточная активность, %
—	—	100
HgCl ₂	0,01	49±3 (52)
<i>n</i> -Оксимеркурибензоат	0,1	57±4
<i>N</i> -Этилмалеимид	1	105±5 (95)
5,5'-Дитиобис(2-нитробензоат)	1	98±5

Таблица 2

Влияние HgCl₂ (0,1 мМ) на активность пирофосфатазы
в зависимости от концентраций комплекса Mg²⁺-PP₁ и
иона Mg²⁺

[MgPP ₁], мкМ	[Mg ²⁺], мМ	Активность *, МЕ/мг	
		А	Б
100	1	520±30	270±20 (52%)
5	1	330±10	190±30 (58%)
5	0,01	27,5±0,5	13,7±0,2 (50%)

* А — в присутствии дитиозритрита, Б — в отсутствие дитиозритрита.

Этот эффект не возрастал при увеличении концентрации ингибиторов в 5 раз. Два других реагента, *N*-этилмалеимид и дитиобис(нитробензоат), не влияли на активность пирофосфатазы, причем обработка фермента *N*-этилмалеимидом не снижала его чувствительность к HgCl₂ и *n*-оксимеркурибензоату. Это означает, что *N*-этилмалеимид не способен модифицировать центр связывания ртутных соединений.

При обработке фермента иодом инаktivация происходила в две стадии, каждая из которых уменьшала активность на 50% (рисунок). Пирофосфатаза, модифицированная по первой стадии и сохранившая 48% активности, не ингибировалась под действием HgCl₂. Это указывает на то, что действие иода направлено на центр связывания ртутных соединений. Окисление иодом по первой стадии приводило к полному исчезновению SH-групп, содержание которых определяли с помощью дитиобис(нитробензоата) после денатурации белка хлоргидратом гуанидина. Исходное содержание SH-групп в пирофосфатазе составляло 2,4±0,05 моль/моль. В отсутствие денатурирующего агента модификация сульфгидрильных групп под действием дисульфида происходила за 5 мин менее чем на 1%. При неполном протекании первой стадии инаktivации иодом количество немодифицированных групп коррелировало с остаточной активностью, если считать, что полная модификация приводит к уменьшению активности на 50%. Учитывая также тот факт, что скорость первой стадии на несколько порядков выше скорости реакции иода с ароматическими аминокислотами [12], можно заключить, что уменьшение активности фермента под действием иода и ртутных соединений связано с модификацией SH-групп.

Снижение активности пирофосфатазы при модификации остатков цистеина могло быть следствием уменьшения максимальной скорости реакции или сродства к субстрату (комплексу Mg²⁺-PP₁) и металлу-активатору. В связи с тем что определение индивидуальных констант сродства в этой сложной реакции довольно трудоемко, для анализа был использован более простой способ. Были измерены величины ингибирования, вызываемого HgCl₂, при трех комбинациях концентраций Mg²⁺-PP₁ и Mg²⁺: насыщающих концентрациях обоих реагентов, насыщающей концентрации одного и ненасыщающей — другого и ненасыщающих кон-

центрациях обоих реагентов. Константы диссоциации комплекса фермента с $Mg^{2+}-PP_i$ составляют около 10 мкМ [10], а с $Mg^{2+}-15$ мкМ (первый центр) и 100–150 мкМ (второй центр) [13]. Из данных, приведенных в табл. 2, видно, что ингибирование во всех случаях составляло около 50%. Это значит, что под действием ингибитора изменяется только максимальная скорость катализа.

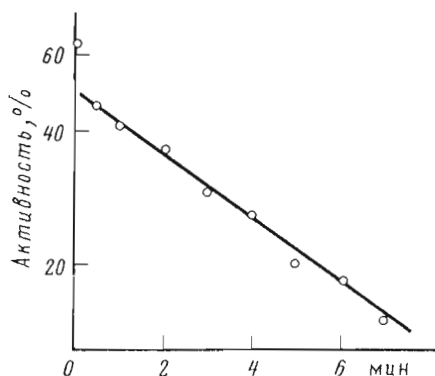
То, что активность фермента падает под действием SH-реагентов вдвое, могло означать, что модификация происходила только в одной субъединице димера, которая в результате полностью инактивировалась. Этому, однако, противоречат

данные для иода. Кроме того, активность мономерной формы фермента, в которой реакционная способность всех SH-групп должна быть одинаковой, падала под действием $HgCl_2$ также на 50% (табл. 1).

Одно из самых интересных свойств неорганической пирофосфатазы состоит в ее способности синтезировать из P_i в отсутствие внешнего источника энергии почти стехиометрическое количество PP_i и прочно удерживать его в активном центре [14]. Параллельно идет фосфорилирование некаталитического центра фермента. При концентрации P_i , меньшей 2 мМ, происходит только второй процесс. И фосфорилирование и синтез PP_i сильно ингибировались ионами ртути. При концентрации P_i , 1 мМ включение уменьшалось от 1 до 0,21 моль/моль, т. е. в 4,8 раза, а при концентрации P_i , 10 мМ — от 4,4 до 0,48 моль/моль. Так как во втором случае в виде пирофосфата было исходно связано 3,7 моль P_i /моль, синтез PP_i ингибировался не менее чем в 7,8 раза.

Полученные данные показывают, что SH-группы не входят в активный центр неорганической пирофосфатазы, поскольку их исчерпывающая модификация не приводит к полной утрате ферментативной активности. В то же время каталитические свойства фермента при этом сильно изменяются. Гидролиз $Mg^{2+}-PP_i$ замедляется вдвое за счет уменьшения максимальной скорости. Следовательно, состояние SH-групп влияет на стадию, лимитирующую скорость процесса. Данные по влиянию $HgCl_2$ на синтез связанного с белком PP_i указывают на то, что скорости некоторых нелимитирующих стадий обратимой реакции $2P_i \rightleftharpoons PP_i$ изменяются при этом значительно сильнее. Синтез связанного PP_i представляет собой частичное обращение его гидролиза ферментом в растворе. Скорость этого синтеза очень велика, и лимитирующей стадией процесса накопления PP_i в растворе является его выход из активного центра [15]. Поэтому уменьшение равновесной концентрации соединения белка с PP_i в 8 раз означает, что во столько же раз замедлилось его образование из P_i или ускорилось разложение с отщеплением P_i .

Реакционная способность сульфгидрильных групп нативной неорганической пирофосфатазы существенно ниже, чем у цистеина, поскольку они не алкилируются и не вступают в реакцию тиол-дисульфидного обмена. По рентгеноструктурным данным, SH-группы фермента находятся вблизи зоны контакта субъединиц [16, 17]. Однако образование четвертичной структуры само по себе не является причиной понижения их реакционной способности, так как и в мономерном ферменте они не реагируют с N-этилмалеимидом. Вероятнее всего, SH-группы образуют водородную связь, обеспечивающую оптимальную структуру каталитического и некаталитического центров. Косвенным подтверждением участия остатка цистеина в формировании третичной структуры пирофосфатазы служат данные о том, что интактность SH-групп абсолютно необходима при ренату-



Кинетика инактивации пирофосфатазы иодом (0,6 мМ). Ось ординат в логарифмическом масштабе

рации фермента после обработки хлоргидратом гуанидина или мочевиной [18, 19]. Возможно также, что фермент существует в двух конформационных состояниях, причем в одном из них (термодинамически более выгодном) SH-группы недоступны для модификации. Оба объяснения согласуются как с инертностью SH-групп, так и с тем фактом, что три разных реагента (под. $HgCl_2$ и *n*-оксимеркурибензоат) изменяют активность фермента в одинаковой степени. Действительно, характер изменения структуры белка при модификации SH-групп в этих случаях, скорее всего, не будет зависеть от природы реагента. Если бы причиной ингибирования был прямой контакт реагента, присоединенного к остатку цистеина, с активным центром или другими элементами белковой молекулы, такая зависимость существовала бы.

Экспериментальная часть

Неорганическую пиррофосфатазу с уд. акт. около 500 МЕ/мг (рН 7,2; 25° С) получали по методике Брага и др. [10]. По данным электрофореза в полиакриламидном геле [20], чистота препарата была не ниже 90%. Каталитически активную растворимую мономерную форму фермента получали малеилированием нативной димерной формы при рН 10,5. Методика малеилирования и свойства мономерного фермента будут описаны в последующей публикации. Большинство реактивов были отечественного производства, за исключением 5,5'-дитиобис(2-нитробензойной кислоты) (Serva, ФРГ), *n*-хлормеркурибензоата (Chemapol, ЧССР), *N*-этилмалеимида (BDH, Англия), хлоргидрата гуанидина (Fluka, Швейцария) и буферных веществ (Sigma, США).

Активность фермента определяли непрерывным методом по образованию P_i с помощью автоматического анализатора [21]. Реакционная среда объемом 5 мл содержала, если не указано особо, 20–50 мкг/л фермента, 0,05 М буфер оксиэтилпиперазинэтансульфонат — NaOH (рН 7,2), 0,2 мМ $Na_4P_2O_7$ и 2 мМ $MgCl_2$. Каждое измерение повторяли 2–3 раза и рассчитывали среднее отклонение.

При изучении влияния SH-реагентов на активность (табл. 1, рисунок) их прибавляли прямо в реакционную смесь, не содержащую PP_i . После 5-минутной инкубации с ферментом добавляли $Na_4P_2O_7$ и измеряли начальную скорость его гидролиза. В случае изучения влияния иода реакцию проводили в 0,05 М буфере 2-амино-2-метил-1,3-пропандиол-HCl (рН 8,0) в присутствии 0,2 М KI при концентрации фермента 2,5 мг/л. Иод прибавляли в виде смеси 86 мМ I_2 и 0,2 М KI в воде. Через определенные промежутки времени отбирали аликвоты объемом 50 мкл и определяли остаточную активность как описано выше, но в присутствии 0,2 М KI и 1 мМ $Na_2S_2O_3$ для нейтрализации иода.

Модификацию иодом при анализе на SH-группы проводили в 0,1 М калий-фосфатном буфере, рН 8, в присутствии 2 мМ EDTA при концентрации белка 4,4 мг/мл. К 60 мкл этого раствора добавляли 2,4 мкл смеси 10 мМ I_2 — 25 мМ KI, инкубировали 1 мин и останавливали реакцию действием 1 мМ $Na_2S_2O_3$.

Для изучения влияния Mg^{2+} — PP_i и Mg^{2+} на инактивацию фермента $HgCl_2$ (табл. 2) фермент (20 мг/л) инкубировали 30 мин с 10^{-4} М $HgCl_2$ в 0,05 М буфере оксиэтилпиперазинэтансульфонат — KOH, рН 7,2, в присутствии 0,5 мМ $MgCl_2$. После этого сравнивали активности в присутствии 0,1 мМ дитиозритрита, который снимал ингибирующее действие $HgCl_2$ (контроль), и без него. Общие концентрации $MgCl_2$ и PP_i , необходимые для создания требуемых концентраций комплекса Mg^{2+} — PP_i и свободного иона Mg^{2+} (табл. 2), рассчитывали как описано ранее [22].

Содержание SH-групп определяли методом Элмана [23]. К 60–80 мкл раствора фермента концентрацией 4–4,4 мг/мл прибавляли 520 мкл 6 М раствора хлоргидрата гуанидина в 0,1 М калий-фосфатном буфере (рН 8), содержавшем 2 мМ EDTA. Смесь инкубировали 10 мин, а затем прибавляли 30 мкл 20 мМ раствора 5,5'-дитиобис(2-нитробензоата) в этом же буфере. Через 5 мин измеряли прирост поглощения при 412 нм относительно контрольной смеси без фермента. Для расчета использовали моляр-

ный коэффициент поглощения тионитробензоата $13\,600\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$. Тиосульфат натрия (1 мМ) не влиял на определение.

Реакцию фермента с P_i и определение его включения в белок проводили как описано ранее [14].

Все эксперименты проводили при 25°C .

Авторы признательны Н. И. Бакулевой и В. Н. Кашо за помощь в некоторых экспериментах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Cohen S. A., Sterner R., Keim P. S., Heinrikson R. L. J. Biol. Chem., 1978, v. 253, № 3, p. 714-725.
2. Hansen G., Eifler R., Heitmann P. Acta biol. et med. Germ., 1972, B. 28, № 5, S. 977-987.
3. Аваева С. М., Ковальчук О. В. Химия природн. соедин., 1971, т. 6, с. 813-815.
4. Negi T., Samejima T., Irie M. J. Biochem., 1971, v. 70, № 2, p. 359-363.
5. Cooperman B. S., Chiu N. Y. Biochemistry, 1973, v. 12, № 9, p. 1676-1682.
6. Шафранский Ю. А., Аваева С. М., Когельников А. И. Биооргани. химия, 1975, т. 1, № 2, с. 203-207.
7. Плаксина Е. А., Сергиенко О. В., Скляпкина В. А., Аваева С. М. Биооргани. химия, 1981, т. 7, № 3, с. 357-364.
8. Yano Y., Negi T., Irie M. J. Biochem., 1973, v. 74, № 1, p. 67-76.
9. Eifler R., Hahn V., Hermann I. Acta biol. et med. Germ., 1972, B. 28, № 4, S. 707-709.
10. Брага Э. А., Байков А. А., Аваева С. М. Биохимия, 1973, т. 38, № 2, с. 344-350.
11. Good N. E., Wingett E. D., Winter E., Connolly T. N., Izawa S., Singh R. M. M. Biochemistry, 1966, v. 5, № 2, p. 467-477.
12. Mayberry W. E., Rall J. E., Bertolli D. J. Amer. Chem. Soc., 1964, v. 86, № 15, p. 5302-5307.
13. Baykov A. A., Tam-Villoslado J. J., Awaeva S. M. Biochim. et biophys. acta, 1979, v. 569, № 3, p. 228-238.
14. Bakuleva N. P., Nazarova T. I., Baykov A. A., Awaeva S. M. FEBS Lett., 1981, v. 124, № 2, p. 245-247.
15. Janson C. A., Degani C., Boyer P. D. J. Biol. Chem., 1979, v. 254, № 10, p. 3743-3749.
16. Bunick G., McKenna G. P., Scarbrough F. E., Uberbacher E. C., Voet D. Acta cryst., 1978, v. B34, № 8, p. 3210-3215.
17. Махалдиани В. В., Смирнова Е. А., Воронова А. А., Куранова И. П., Арутюнян Э. Г., Вайнштейн В. К., Хёне В., Хансен Г. Докл. АН СССР, 1981, т. 240, № 6, с. 1478-1481.
18. Heitmann P., Scholz S., Hansen G. Studia biophys., 1972, B. 33, № 2, p. 99-106.
19. Yano Y., Irie M. J. Biochem., 1975, v. 78, № 5, p. 1001-1011.
20. Davis B. J. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1964, v. 121, № 2, p. 404-427.
21. Baykov A. A., Awaeva S. M. Anal. Biochem., 1981, v. 116, № 1, p. 1-4.
22. Шафранский Ю. А., Байков А. А., Андрукович П. Ф., Аваева С. М. Биохимия, 1977, т. 42, № 7, с. 1244-1251.
23. Ellmann G. L. Arch. Biochem. and Biophys., 1959, v. 82, № 1, p. 70-77.

Поступила в редакцию
31.VII.1981

CHANGES IN FUNCTIONAL PROPERTIES OF YEAST INORGANIC PYROPHOSPHATASE UPON SH-GROUP MODIFICATION

BAYKOV A. A., KRASNOVA V. I., AVAEVA S. M.

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

Iodine, HgCl_2 and *p*-hydroxymercuribenzoate decrease the maximal velocity of MgPP_i hydrolysis of inorganic pyrophosphatase by 2 times, and its phosphorylation and protein-bound PP_i synthesis by 5-8 times. Enzyme inactivation by iodine correlates with the oxidation of two SH-groups per dimer. The SH-groups do not react with N-ethylmaleimide and 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoate). The results show that the cysteine residues possess diminished reactivity and, although affecting it, are not directly implicated in the catalysis.