



УДК 577.152.361.02

## ИЗУЧЕНИЕ РЕАКЦИЙ ОБМЕНА $^{18}\text{O}$ , КАТАЛИЗИРУЕМЫХ ДИМЕРНОЙ И МОНОМЕРНОЙ ФОРМАМИ НЕОРГАНИЧЕСКОЙ ПИРОФОСФАТАЗЫ

*Аваева У. М., Байков А. А., Баши В. Н.*

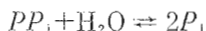
*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Межфакультетская проблемная научно-исследовательская лаборатория молекулярной биологии и биоорганической химии им. А. П. Белозерского*

*Пантелева Н. С., Скворцович Е. Г.*

*Ленинградский государственный университет им. А. А. Жданова, биолого-почвенный факультет*

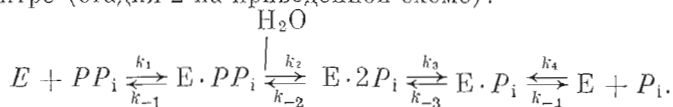
Обмен  $^{18}\text{O}$  между  $P_i$  и водой (прямой обмен) за счет фосфорилирования некаталитического центра неорганической пирофосфатазы пиварских дрожжей составляет не менее 10% от обмена за счет обратимого синтеза  $PP_i$  в активном центре фермента. Прямой обмен  $\text{H}_2\text{O}-P_i$  и интермедиарный обмен при гидролизе  $PP_i$  значительно ускоряются в присутствии KCl. Прямой обмен замедляется в 4,5–8 раз при модификации SH-групп фермента или введении в реакционную среду 1 мМ АТФ, хотя активность уменьшается при этом не более чем на 50%. Величина коэффициента распределения ( $K_p$ ) для интермедиарного обмена увеличивается от 0,29 до 0,79 под действием 10 мМ  $P_i$ . Мономерная форма пирофосфатазы неспособна катализировать аналогичные реакции обмена  $^{18}\text{O}$ . Эти результаты показывают, что ионы  $\text{K}^+$ , соседняя субъединица и состояние некаталитического центра оказывают сильное влияние на стадию, не лимитирующую скорость гидролиза  $PP_i$ .

Неорганическая пирофосфатаза (КФ 3.6.1.1) катализирует обратимую реакцию гидролиза — синтеза пирофосфата ( $PP_i$ )



и интересна как простейший представитель группы ферментов, осуществляющих перенос фосфорильной группы от полифосфата на воду. Эти ферменты, к числу которых относятся АТФ-азы, интенсивно исследуются, однако механизм действия ни для одного из них пока не известен. Так как катализируемые ими реакции сопровождаются разрывом или образованием связи  $\text{P}-\text{O}$ , то ценную информацию о химическом механизме и скоростях отдельных стадий реакций дает изучение обмена стабильного изотопа  $^{18}\text{O}$  между субстратами и продуктами [1, 2].

Неорганическая пирофосфатаза катализирует две реакции обмена  $^{18}\text{O}$ . Первая из них происходит одновременно с гидролизом  $PP_i$ . В соответствии со стехиометрией реакции гидролиза в каждую вторую молекулу  $P_i$  должен включаться один атом кислорода воды. Однако в определенных условиях содержание атомов кислорода воды в продукте составляет 1,32 на две молекулы  $P_i$  [3]. Дополнительное включение происходит на промежуточной стадии реакции и обычно называется интермедиарным обменом. Кроме того, пирофосфатаза катализирует обмен  $^{18}\text{O}$  между  $P_i$  и водой в отсутствие  $PP_i$  («прямой обмен») [4]. Первоначально предполагалось, что прямой обмен объясняется обратимым фосфорилированием активного центра фермента [4], однако попытки обнаружить такое ковалентное соединение в ходе катализа оказались безуспешными. По этой причине сейчас более популярен предложенный Бойером и сотр. [5] механизм обмена, согласно которому и прямой, и интермедиарный обмены происходят в результате многократного обращения стадии гидролиза  $PP_i$ , связанного в активном центре (стадия 2 на приведенной схеме):



Влияние  $MgCl_2$  и  $KCl$  на скорость прямого обмена  
 $H_2O - P_i$ , катализируемого пирогосфатазой  
 $[P_i] 10 \text{ мМ}$

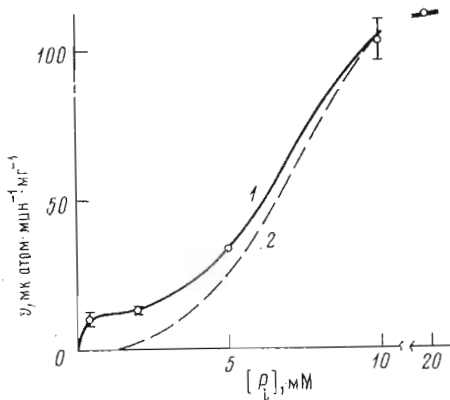
Номер опыта	$[MgCl_2]$ , мМ	$[KCl]$ , мМ	Обмен, мк атом· мин <sup>-1</sup> ·мг <sup>-1</sup>
Димерный фермент			
1	1	—	102±7
2	1	20	301±18
3	10	—	260±20
4	50	—	280±3
5	50	20	501±12
Мономерный фермент			
6	50	—	9±1
7	50	50	6±2

Отщепление  $PP_i$  в раствор ( $k_{-1}$ ) происходит медленно, поэтому полное обращение реакции гидролиза не вносит заметного вклада в общий обмен [3, 4, 7]. Важной характеристикой реакции обмена служит коэффициент распределения  $K_p = k_{-2}/(k_{-2} + k_3)$  [3]. Он представляет собой вероятность того, что образовавшееся соединение  $E \cdot 2P_i$  превратится в  $E \cdot PP_i$  и произойдет обмен. Величина  $K_p$  может изменяться от 0 до 1. Используя  $P_i$ , меченный  $^{32}P$ , Дегани и др. [5] показали, что в реакции с  $P_i$  фермент действительно образует  $E \cdot PP_i$  в количестве 5%. Впоследствии это соединение было выделено гель-фильтрацией, причем выход удалось увеличить почти до 100%, исключив ионы  $K^+$  из среды [7]. Скорость образования  $E \cdot PP_i$  достаточна для объяснения прямого обмена [5]. Эти данные служат важным подтверждением механизма обмена, предложенного Бойером и сотр. Недавно, однако, было обнаружено, что при взаимодействии фермента с фосфатом наряду с синтезом связанного в активном центре  $PP_i$  происходит ковалентное присоединение  $P_i$  к некаталитическому центру [7–9]. Реакция фосфорилирования протекает обратимо с константой скорости более  $50 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$  [7, 8], поэтому нельзя исключить, что этот процесс может вносить заметный или даже основной вклад в общий обмен.

Важным аспектом изучения обмена  $^{18}O$ , катализируемого пирогосфатазой и родственными ей АТР-азами, является выяснение роли их четвертичной структуры. Все они состоят из нескольких субъединиц, и косвенные данные, полученные для протонной АТР-азы, показали, что взаимодействие активных центров может быть определяющим при обмене [10]. Пирогосфатаза, молекула которой состоит из двух одинаковых субъединиц, удобна для прямой проверки этого предположения, так как она единственный фермент этой группы, для которого описано получение активной мономерной формы [11, 12].

Исходя из сказанного, при выполнении настоящей работы мы поставили перед собой три основные задачи: оценить вклад некаталитического центра в обмен  $^{18}O$ , проверить значение субъединичной структуры для обменных реакций и установить влияние на них катионов ( $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ ) и  $P_i$ , определяющих концентрацию  $E \cdot PP_i$  в стационарном состоянии.

*Влияние состава среды на прямой обмен  $H_2O - P_i$ .* Во всех предшествующих работах [3–6, 13] измерения обмена  $^{18}O$  между  $P_i$  и водой под действием пирогосфатазы проводились в присутствии ионов  $K^+$  в среде (до 0,3 М). Поскольку недавно было обнаружено [7, 14], что ионы щелочных металлов оказывают сильное влияние на реакции синтеза  $PP_i$  в активном центре пирогосфатазы и фосфорилирования ее некаталитического центра, мы сравнили скорость прямого обмена в присутствии 20 мМ соли калия и без нее. Эти эксперименты мы проводили при нескольких концентрациях ионов  $Mg^{2+}$ , без которых реакции обмена не происходят. Как видно из табл. 1, соль калия примерно в 3 раза увеличивает скорость прямого обмена при концентрации  $MgCl_2$  1 мМ. Этот эффект нельзя объяснить тем, что ионы  $K^+$  каким-то образом заменяют ионы  $Mg^{2+}$  в качестве активатора



Влияние концентрации тетраметиламмонийфосфата на скорость прямого обмена димерной пирофосфатазой (1). Кривая (2) показывает долю фермента в форме  $E \cdot PP_1$  (взята из работы [7]). Концентрация  $MgCl_2$  1 мМ

Интересно, что каталитическая константа для гидролиза  $PP_1$  не изменяется в присутствии  $KCl$ . Это значит, что скорости прямого обмена и гидролиза лимитируются разными стадиями.

Данные по влиянию концентрации  $P_1$  на прямой обмен в отсутствие  $KCl$  представлены на рисунке. Здесь же приведена кривая относительного содержания комплекса  $E \cdot PP_1$ , которая была получена ранее [7] в одной из наших лабораторий. Ее масштаб по вертикали выбран с таким расчетом, чтобы кривые совпали в точке 20 мМ. При этой концентрации фосфата 96% активных центров заполнены синтезированным  $PP_1$  [7]. Как видно, ход двух кривых в области высоких концентраций  $P_1$  примерно одинаков. Заметное расхождение наблюдается при малом содержании  $P_1$ . При концентрации  $P_1$  0,4 мМ средняя величина скорости обмена в шести независимых опытах составила  $9,6 \pm 2,3\%$  от максимальной, тогда как содержание  $E \cdot PP_1$  не превышает при этом ошибки определения, равной примерно 2% [7]. Известно [7, 8], что в этих условиях происходит быстрообратимое фосфорилирование некаталитических центров пирофосфатазы с образованием ацилфосфатной связи, причем степень заполнения некаталитических центров близка к 100% при концентрации  $P_1$  около 1 мМ. По всей видимости, при низком содержании  $P_1$  прямой обмен протекает в основном в некаталитическом центре.

Если из величины общей скорости обмена вычесть вклад некаталитического центра, обнаружится полная корреляция с содержанием комплекса  $E \cdot PP_1$ . Спрингс и др. [13] отмечали существование аналогичной корреляции для общей скорости обмена в присутствии  $KCl$  и содержания  $MgCl_2$  более 10 мМ. В таких условиях мы также не видели заметной двухфазности на концентрационной зависимости обмена. Вероятно, это означает, что скорость обмена на некаталитическом центре не возрастает при добавлении  $KCl$  и увеличении концентрации  $MgCl_2$  в отличие от обмена за счет синтеза  $PP_1$ , в результате чего доля некаталитического центра становится незначительной уже при сравнительно низкой концентрации  $P_1$ .

Реакция обмена  $H_2O - P_1$  в целом, по-видимому, каким-то образом связана с фосфорилированием некаталитического центра. Так, АТФ в концентрации 1 мМ более чем на 80% ингибировал прямой обмен при содержании  $P_1$  2 и 10 мМ в условиях, в которых проводили опыт 1 табл. 1. Концентрацию  $MgCl_2$  при этом увеличивали до 2 мМ для учета образования комплекса с АТФ. Известно, что АТФ не влияет на константу Михаэллса для  $PP_1$  в реакции гидролиза и, следовательно, не связывается в активном центре, но в то же время очень сильно уменьшает связывание фосфата среды в некаталитическом центре [15]. Таким образом, состояние некаталитического центра очень важно для протекания прямого обмена.

реакции обмена, так как почти такое же стимулирующее действие  $KCl$  наблюдалось при насыщающей концентрации  $MgCl_2$  (50 мМ) и соль калия сама по себе не способна активировать обмен. Увеличение концентрации  $P_1$  от 10 до 20 мМ практически не изменяло скорость обмена в присутствии 1 мМ  $MgCl_2$ . Прибавление к реакционной среде 0,2 М хлорида тетраметиламмония вместо  $KCl$  при концентрациях  $MgCl_2$  1 и 50 мМ увеличивало скорость обмена менее чем на 15%. Основываясь на этих данных, следует считать наиболее вероятным объяснением влияния ионов  $K^+$  существование у комплекса фермента с  $P_1$  специфического центра, заполнение которого ионом  $K^+$  приводит к сильному изменению скорости лимитирующей стадии обмена.

*Влияние модификации SH-групп на прямой обмен  $H_2O-P_1$ .* Малые количества иода модифицируют в пиррофосфатазе два остатка цистеина на молекулу белка, в результате чего гидролитическая активность снижается на 50% [6]. Скорость прямого обмена падала при этом значительно сильнее. В условиях, которые были использованы в опыте 1 табл. 1, она составила  $13,6 \pm 1,2$  мкатом·мин<sup>-1</sup>·мг<sup>-1</sup>, т. е. 13% исходной. Интересно, что модификация пиррофосфатазы иодом примерно в такой же степени подавляла фосфорилирование некаталитических центров и синтез связанного с белком  $PP_1$  [6].

*Влияние состава среды на интермедиарный обмен.* Интермедиарный обмен происходит в процессе гидролиза  $PP_1$ , скорость которого сильно зависит от состава среды. По этой причине интенсивность такого обмена удобнее характеризовать не скоростью, а степенью замещения атомов кислорода в продукте гидролиза ( $O'$ ) или величиной упомянутого выше коэффициента  $K_p$ . В том случае, если обмен не происходит, при гидролизе каждой молекулы  $PP_1$  в среде с  $H_2^{18}O$  в фосфате появляется один атом  $^{18}O$  и величина  $K_p$  равна нулю. Если же интермедиарный обмен протекает очень интенсивно, включение  $^{18}O$  в  $P_1$  будет приближаться к четырем, а величина  $K_p$  — к единице.

Сказанное имеет силу при выполнении двух основных условий. Одно из них заключается в том, что два остатка  $P_1$  связанного пиррофосфата не обмениваются местами и лишь один из них содержит электрофильный центр для атаки молекулой  $H_2O$ . Выполнение этого условия следует из данных Хэгни [6]. Согласно второму условию, все четыре атома кислорода в связанном  $P_1$  быстро (по сравнению с синтезом  $PP_1$ ) меняются местами за счет вращения вокруг атома фосфора. Выполнение этого условия не является строго доказанным для пиррофосфатазы, но представляется очень вероятным на основании данных, полученных для других ферментов, и согласуется с характером изменения доли форм  $P_1$ , содержащих разное число атомов  $^{18}O$ , в ходе обменных реакций [3, 6]. Подробнее этот вопрос рассмотрен в работе Хэгни [6].

Обратившись к интермедиарному обмену, мы проверили его зависимость от  $MgCl_2$ , фосфата, а также ионов  $K^+$ , которые сильно влияли на прямой обмен (табл. 2). В отсутствие  $KCl$  и  $P_1$  интермедиарный обмен не наблюдается, если отношение концентраций  $MgCl_2$  и  $PP_1$  было меньше единицы. Этот интересный факт уже был отмечен ранее [3, 6]. Прибавление 50 мМ  $KCl$  увеличивало значение  $K_p$  почти вдвое — до 0,29 (ср. опыты 4 и 5). Хэгни и Бойер получили в сходных условиях 0,24—0,32 [3, 6]. Фосфат в опыте 2 также увеличивал  $K_p$ , но наибольший эффект был обнаружен при совместном присутствии  $KCl$  и  $P_1$  (опыты 3 и 6). Величина  $K_p$  возросла при этом почти до 0,8 при обеих концентрациях  $MgCl_2$ . Скорость гидролиза  $PP_1$  в опытах 1—6, рассчитанная по приросту  $P_1$  за время инкубации, была примерно одинаковой.

Эффект  $P_1$  нельзя объяснить изменением свойств фермента в результате фосфорилирования его некаталитического центра. Даже если фосфат не присутствовал исходно, то за счет гидролиза  $PP_1$  в ходе интермедиарного обмена в растворе накапливалось около 5 мМ  $P_1$ . Так как почти полное заполнение некаталитического центра происходит в присутствии всего 1 мМ  $P_1$ , в опытах без  $P_1$  этот центр был занят в течение  $1/5$  времени инкубации. В таком случае влияние прибавленного  $P_1$  не могло быть большим.

Еще одно объяснение эффекта  $P_1$  могло заключаться в стимуляции им прямого обмена между  $H_2O$  и  $PP_1$ . Ранее мы предположили образование ковалентной связи между белком и  $PP_1$  [17]. Эта гипотеза была основана на наблюдавшемся восстановлении остатка аспарагиновой кислоты белка при действии боргидрида натрия на соединения пиррофосфатазы с  $PP_1$ , однако впоследствии мы пришли к выводу, что этот результат скорее всего объясняется побочным фосфорилированием некаталитического центра, тогда как  $PP_1$  связывается в активном центре нековалентно. Кроме того, прямые опыты не обнаружили обмена между  $PP_1$  и  $H_2O$  в отсутствие  $P_1$  [6].

Вероятнее всего, влияние  $P_1$  на интермедиарный обмен связано с обращением стадий 2—4 гидролиза  $PP_1$  (см. схему). Ранее Спрингс и др. [13]

Зависимость интермедиарного обмена от состава среды  
 $[PP_i]$  5 мМ

Номер опыта	[MgCl <sub>2</sub> ]	[P <sub>i</sub> ]	[KCl]	Активность, микмоль·мин <sup>-1</sup> ·мг <sup>-1</sup>	$\bar{O}$	K <sub>p</sub>
	мМ					
Димерный фермент						
1	2	—	—	735	1,00±0,06	0,00
2	2	10	—	800	1,24±0,06	0,25
3	2	10	50	725	2,38±0,12	0,77
4	5	—	—	675	1,14±0,06	0,16
5	5	—	50	710	1,28±0,06	0,29
6	5	10	50	675	2,46±0,11	0,79
Мономерный фермент						
7	5	10	50	410	1,00±0,06	0,00

предположили, что молекула P<sub>i</sub>, содержащая электрофильный атом фосфора, покидает активный центр первой. Они основывались на том, что величина K<sub>p</sub> для прямого обмена P<sub>i</sub> — H<sub>2</sub>O, определенная по кинетике убывания формы P<sub>i</sub> с четырьмя атомами <sup>18</sup>O, не зависит от концентрации P<sub>i</sub> и не равна единице (0,3±0,01 [6] и 0,23±0,07 [13]). Если это предположение об очередности диссоциации остатков P<sub>i</sub> из активного центра правильно, то наблюдаемое нами увеличение интермедиарного обмена под действием P<sub>i</sub>, вероятно, имеет следующий механизм: фосфат из раствора присоединяется к комплексу E·P<sub>i</sub>, возникающему в ходе реакции, после чего в активном центре образуется и вновь распадается PP<sub>i</sub>. Таким образом, замещение атомов кислорода происходит не только в фосфате, полученном из PP<sub>i</sub>, но и в присутствовавшем исходно. Это объяснение можно было бы проверить, взяв меченый PP<sub>i</sub> или с помощью так называемого встречного опыта, который отличается от опыта по интермедиарному обмену только тем, что метка (<sup>18</sup>O) исходно присутствует не в H<sub>2</sub>O, а в P<sub>i</sub>. К сожалению, в нашем случае это наталкивается на серьезные технические трудности, связанные, например, с необходимостью точно измерить уменьшение содержания <sup>18</sup>O в P<sub>i</sub> всего на 10%.

*Мономерная форма пирофосфатазы как катализатор обмена <sup>18</sup>O.* Мономерная пирофосфатаза, полученная методом малеилирования, почти не отличается от димерной по каталитическим свойствам в гидролизе PP<sub>i</sub> и, так же как и последняя, образует в активном центре PP<sub>i</sub> и фосфорилируется по некаталитическому центру при взаимодействии с P<sub>i</sub> [8, 12]. В то же время она практически не катализировала прямой и интермедиарный обмены <sup>18</sup>O в условиях, оптимальных для димерной пирофосфатазы (табл. 1 и 2). В рамках предложенного механизма (см. схему) это означает, что в результате диссоциации пирофосфатазы сильно уменьшилась какая-то из констант k<sub>-2</sub>, k<sub>-3</sub> или k<sub>-4</sub>.

В совокупности наши данные не противоречат предположению Бойера о том, что прямой обмен H<sub>2</sub>O — P<sub>i</sub> происходит главным образом за счет обратимого синтеза PP<sub>i</sub> в активном центре пирофосфатазы. В то же время они допускают альтернативное объяснение обмена обратимым фосфорилированием некаталитического центра. Корреляцию между скоростью обмена и содержанием E·PP<sub>i</sub> при высокой концентрации P<sub>i</sub> на рисунке можно в принципе объяснить тем, что заполнение активного центра синтезированным PP<sub>i</sub> сильно ускоряет фосфорилирование некаталитического центра. С этим хорошо согласуется резкое замедление обмена при блокировании некаталитического центра АТР (при этом активный центр остается свободным [15]). Во всяком случае, выяснение детальной последовательности процессов, приводящих к обмену <sup>18</sup>O, а следовательно, и механизма действия пирофосфатазы невозможно без установления роли некаталитического центра. Косвенные данные о взаимовлиянии активного и некаталитическо-

го центров были также получены при изучении фосфорилирования последнего [8]. Наблюдавшуюся кооперативность связывания  $P_i$  можно объяснить возможностью быстрой миграции  $P_i$  из активного центра в некаталитический без освобождения в раствор. Таким образом, некаталитический центр может играть роль промежуточной площадки связывания на пути молекулы  $P_i$  из раствора в активный центр и обратно. Подробнее этот механизм будет рассмотрен в последующей публикации.

Второй не учтенный пока фактор обмена — взаимовлияние субъединиц. Возможно, что оно проявляется на уровне некаталитических центров. Их фосфорилирование в димере протекает по механизму типа «флип-флоп» [8], в результате чего в каждый момент времени ковалентная связь с  $P_i$  существует лишь в одной из субъединиц. Во второй субъединице  $P_i$  связан в некаталитическом центре нековалентно, и, вероятно, именно он может быстро перемещаться в активный центр и обратно. В мономере  $P_i$  связывается некаталитическим центром только прочной ковалентной связью и скорость связывания, а следовательно, и предполагаемого переноса в активный центр при этом значительно ниже [8].

В рамках приведенной схемы целью объяснить то, что, вызывая сильное увеличение интермедиарного обмена,  $P_i$  не ингибирует при этом гидролиз  $PP_i$ . Если механизм такого обмена состоит в обращении стадий 2—4, то отсутствие ингибирования означает, что они не лимитируют скорость гидролиза. Так как концентрация  $PP_i$  в этих опытах является насыщающей, присоединение  $PP_i$  к ферменту также не может лимитировать процесс гидролиза. Получающееся противоречие можно объяснить существованием стадии изомеризации комплекса  $E \cdot PP_i$ , которая лимитирует распад  $PP_i$ . Для обмена изомеризация не нужна, поэтому его скорость определяется лишь стадиями 2—4.

### Экспериментальная часть

Неорганическую пирофосфатазу с уд. акт. 650—750 МЕ/мг при 25° С выделяли из пекарских дрожжей по методике Брага и др. [18]. Растворимую мономерную форму фермента получали малеилированием нативной димерной формы при pH 10,5 [12]. Факт диссоциации на субъединицы проверяли каждый раз по коэффициенту седиментации [12]. Для модификации SH-групп пирофосфатазы к 0,4 мл раствора белка с концентрацией 0,25 мг/мл в буфере 0,1 М трис-HCl, pH 7,2, содержащем 1 мМ  $MgCl_2$ , прибавляли 10 мкл смеси 0,2 мМ  $I_2$  — 0,5 мМ KI и инкубировали 1 мин при 20° С [16]. Уменьшение активности фермента на 55% служило критерием того, что при модификации пирофосфатазы не затрагивались другие функционально важные группы [16].

Вода, обогащенная на 50% изотопом  $^{18}O$ , была получена из объединения «Изотоп». Меченый фосфат был приготовлен реакцией  $P_2O_5$  с меченой водой. Фосфат, пирофосфат и АТФ использовали только в виде тетраметил-аммониевых солей. Для их получения запасные растворы калиевых или натриевых солей указанных соединений пропускали через колонку с дауэксом 50×8 в  $H^+$ -форме и доводили pH элюатов до 7,2 раствором гидроксида тетраметиламмония.

Обменные реакции изучали при 25° С в среде, содержащей 0,05 М буфер трис-HCl, pH 7,2, и 1 мМ дитиозритрит.

*Прямой обмен  $H_2O$ — $P_i$ .* Объем реакционной среды при концентрации  $P_i$  0,4 мМ составлял 20 мл, а в остальных случаях выбирался с таким расчетом, чтобы содержащее  $P_i$  в пробе было 20 мкмоль. Исходное содержание  $^{18}O$  в фосфате было 9—18 ат. %. Реакцию начинали прибавлением фермента (0,8—4 мг/л) и проводили ее 30 мин. Для ее остановки среду подкисляли соляной кислотой до pH 3, после чего прибавляли 80 мкмоль немеченого  $P_i$ . В контрольных экспериментах было обнаружено, что в процессе инкубации активность фермента не падает. Дальнейшие операции выделения и анализа  $P_i$  проводили по описанным методикам [19] с некоторыми модификациями. Для удаления АТФ, если необходимо, раствор обрабатывали активированным углем. Затем прибавляли 0,5 мл

насыщенного раствора  $\text{BaCl}_2$  и подщелачивали раствор до pH 8. Фосфат бария осаждали центрифугированием в течение 3 мин при 1500g, дважды промывали водой и растворяли в 1 мл воды, прибавляя по каплям 1 М HCl. Катионы металлов удаляли пропусканием раствора через колонку (0,8×5 см) с дауэксом 50×8 в  $\text{H}^+$ -форме. Фосфат в элюате повторно осаждали раствором  $\text{BaCl}_2$  при 6,8–7,0 в токе  $\text{N}_2$ , центрифугировали, промывали 1 мл воды (1 раз), этилового спирта (2 раза) и диэтилового эфира (1 раз) и выдерживали 1 ч при 115°С в вакууме. Дальнейшую подготовку образца гуанидингидрохлоридным методом и анализ на масс-спектрометре МИ1201 «Сатурн» проводили по описанной методике [20].

*Интермедиарный обмен.* Объем реакционной среды составлял 2 мл. Исходное содержание  $^{18}\text{O}$  в  $\text{H}_2\text{O}$  было 2–5 ат. %. Концентрацию фермента (0,08–0,2 мг/л) и время реакции (10–20 мин) выбирали с таким расчетом, чтобы гидролиз  $PP_1$  в ходе опыта проходил примерно на 50%. Концентрацию фосфата до и после инкубации с ферментом измеряли на автоматическом анализаторе [21]. После этого прибавляли 80 мкмоль немеченого  $P_1$  и отделяли  $PP_1$  на колонке (1×10 см) с дауэксом 1×8 [5]. В дальнейшем выделение  $P_1$  и его анализ на содержание  $^{18}\text{O}$  проводили как в опытах по прямому обмену.

Величины прямого и интермедиарного обмена рассчитывали по известным методикам [19]. Коэффициент распределения  $K_p$  для интермедиарного обмена определяли по соотношению  $K_p = (4\bar{O}' - 4)/3\bar{O}'$  [3], где  $\bar{O}'$  — общее число атомов кислорода, появляющихся в  $P_1$  после гидролиза одной молекулы  $PP_1$ .

Все измерения повторяли не менее 2 раз и рассчитывали средние значения  $\pm$  средние отклонения.

Авторы благодарны проф. Б. С. Куперману (Пенсильванский университет, США) и д-ру Д. Д. Хэрни (университет Карнеги-Меллона, США) за комментарии к их опубликованным работам.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Hackney D. D., Stempel K. E., Boyer P. D. *Methods Enzymol.*, 1980, v. 64, part B, p. 60–83.
2. Пантелеева Н. С. Миозин ( $\text{O}^{18}$  обмен и фосфорилирование). Л.: Изд-во ЛГУ, 1975.
3. Hackney D. D., Boyer P. D. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1978, v. 75, № 7, p. 3133–3137.
4. Cohn M. J. *Biol. Chem.*, 1958, v. 231, № 2, p. 369–379.
5. Janson C. A., Degani C., Boyer P. D. *J. Biol. Chem.*, 1979, v. 254, № 10, p. 3743–3749.
6. Hackney D. D. *J. Biol. Chem.*, 1980, v. 255, № 11, p. 5320–5328.
7. Bakuleva N. P., Nazarova T. I., Baykov A. A., Avaeva S. M. *FEBS Lett.*, 1981, v. 124, № 2, p. 245–247.
8. Бакулева Н. П., Кашо В. Н., Байков А. А., Назарова Т. И., Аваева С. М. *Биохимия*, 1982, т. 47, № 7, с. 1084–1090.
9. Бакулева Н. П., Комиссаров А. А., Кузнецов А. В., Назарова Т. И., Склякина В. А., Аваева С. М. *Химия природы. соедин.*, 1982, № 3, с. 379–384.
10. Hutton R. L., Boyer P. D. *J. Biol. Chem.*, 1979, v. 254, № 20, p. 9990–9993.
11. Плаксина Е. А., Сергиенко О. В., Склякина В. А., Аваева С. М. *Биоорган. химия*, 1981, т. 7, № 3, с. 357–364.
12. Кашо В. Н., Бакулева Н. П., Байков А. А., Аваева С. М. *Биохимия*, 1982, т. 47, № 6, с. 993–998.
13. Springs B., Welsh K. M., Cooperman B. S. *Biochemistry*, 1981, v. 20, № 22, p. 6384–6391.
14. Бакулева Н. П., Кашо В. Н., Байков А. А., Аваева С. М. *Вестн. МГУ. Химия*, 1982, т. 23, № 4, с. 396–401.
15. Бакулева Н. П. Взаимодействие неорганической пирофосфатазы с фосфатом. Дис. ... канд. хим. наук. МГУ: Изд-во МГУ, 1981.
16. Байков А. А., Краснова В. И., Аваева С. М. *Биоорган. химия*, 1982, т. 8, № 2, с. 195–199.
17. Baykov A. A., Bakuleva N. P., Nazarova T. I., Avaeva S. M. *Biochim. et biophys. acta*, 1977, v. 481, № 1, p. 184–194.
18. Брага Э. А., Байков А. А., Аваева С. М. *Биохимия*, 1973, т. 38, № 2, с. 344–350.
19. Пантелеева Н. С., Скворцович Е. Г. В кн.: *Транспортные аденозинтрифосфатазы/Ред. Болдырев А. А. М.: Изд-во МГУ, 1977, с. 101–114.*
20. Ильин Л. А. *Вестн. ЛГУ*, 1966, № 3, с. 85–91.
21. Baykov A. A., Avaeva S. M. *Anal. Biochem.*, 1981, с. 116, № 1, p. 1–4.

Поступила в редакцию  
30.XI.1982

STUDIES ON THE  $^{18}\text{O}$  EXCHANGE REACTIONS CATALYZED BY DIMERIC  
AND MONOMERIC FORMS OF INORGANIC PYROPHOSPHATASE

AVAEVA S. M., BAYKOV A. A., KASHO V. N., PANTELEEVA N. S.,  
SKVORTSEVICH E. G.

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

The  $^{18}\text{O}$  exchange between  $P_i$  and  $\text{H}_2\text{O}$  (medium exchange) due to phosphorylation of the noncatalytic site of baker's yeast inorganic pyrophosphatase amounts to about 10% of the exchange due to the reversible synthesis of  $PP_i$  in the active site. Both the medium and intermediate exchanges in the course of  $PP_i$  hydrolysis are markedly accelerated in the presence of 20–50 mM KCl. The medium exchange is inhibited 4.5–8 times by modification of the enzyme SH-groups or addition of 1mM Mg·ATP, although the enzyme activity is inhibited by less than 50%.  $P_i$  (10 mM) increases the partition coefficient for the intermediate exchange from 0.29 to 0.79. The monomeric form of the pyrophosphatase does not catalyze the  $^{18}\text{O}$  exchange reactions. The results indicate that the  $\text{K}^+$  ions, the neighbouring subunit and the state of the noncatalytic site markedly affect some steps of  $PP_i$  hydrolysis which are not rate-limiting.