



УДК 577.150.4

ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ НЕОРГАНИЧЕСКОЙ ПИРОФОСФАТАЗЫ  
ДРОЖЖЕЙ С ПОМОЩЬЮ СПИН-МЕТКИ НА ОСНОВЕ  
*n*-ХЛОРМЕРКУРОБЕНЗАМИДА

Шафранский Ю. А., Аваева С. М., Котельников А. И.

*Межфакультетская лаборатория биоорганической химии  
Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, Москва,  
Отделение института химической физики Академии наук СССР, Черноголовка*

При обработке неорганической пирофосфатазы из дрожжей *N*-(1-оксил-2,2,6,6-тетраметил-4-пиперидиний)-*n*-хлормеркуробензамидом происходит присоединение одного остатка реагента на молекулу фермента. Спектр ЭПР модифицированного белка свидетельствует о заторможенности спин-метки, величина которой зависит от ионной силы, pH, катионов металлов и субстрата. Из катионов наибольший растормаживающий эффект вызывает  $Zn^{2+}$ ;  $Mg^{2+}$  и  $Ca^{2+}$  практически не изменяют подвижности спин метки. В отсутствие металлов пирофосфат оказывает заметное растормаживающее влияние, исчезающее при добавлении  $Ca^{2+}$ .

При взаимодействии неорганической пирофосфатазы дрожжей (К.Ф. 3.6.1.1) с субстратами и катионами металлов, регулирующими активность этого фермента, происходит изменение спектральных и некоторых других свойств белка [1—6]. Возможно, что это связано с конформационными переходами фермента. В данной работе для проверки такой гипотезы использован метод спиновой метки, позволяющий наблюдать за локальными изменениями пространственной организации макромолекул при различного рода воздействиях. С этой целью была получена неорганическая пирофосфатаза, модифицированная производным *n*-хлормеркуробензамида, содержащим иминоксильный радикал.

*Реакция пирофосфатазы с N*-(1-оксил-2,2,6,6-тетраметил-4-пиперидил)-*n*-хлормеркуробензамидом (R-ПХМБ). С небольшим избытком реагента при pH 7,0 модификация фермента завершается через 10—15 мин. При этом ферментативная активность полностью сохраняется. Количество спин-метки, введенной в молекулу белка, определяли сравнением амплитуды центрального компонента спектров замороженных растворов модифицированного фермента в воде и свободной спин-метки в этаноле. В изученных условиях амплитуда центрального компонента прямо пропорциональна концентрации иминоксильного радикала. Изменение времени реакции в пределах 15—60 мин не изменяло величины включения остатка R-ПХМБ, составлявшей 0,8—1,1 в расчете на молекулу фермента.

Неорганическая пирофосфатаза содержит четыре сульфгидрильные группы, реакционная способность которых по отношению к SH-реагентам заметно различается [7]. Результаты данной работы согласуются с этим. Однако факт повышенной реакционной способности одной из четырех SH-групп фермента, состоящего из двух одинаковых субъединиц, представляет интерес.

Влияние ионной силы и pH на подвижность метки. Степень иммобилизации спин-метки связана с характером белковой поверхности в районе ее связывания. Конформационные перестройки молекулы белка, происходящие в результате изменения ионной силы или pH, а также при связывании

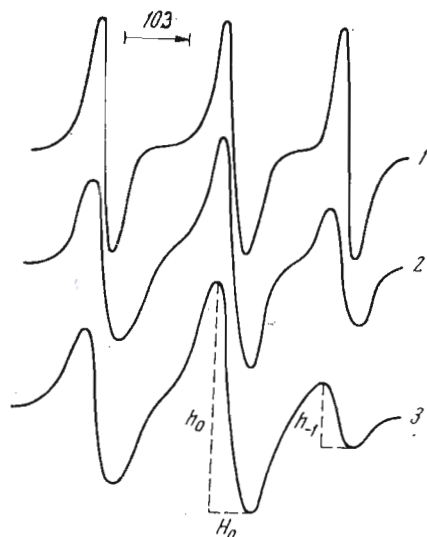


Рис. 1. Спектры ЭПР R-ПХМБ свободного (1) и иммобилизованного на пирофосфатазе при pH 6,0 и ионной силе 0,1 (2) или 0,001 (3)

специфических лигандов могут менять рельеф белка, вызывая изменения в спектре ЭПР метки. Количественной характеристикой изменения подвижности метки служит отношение амплитуд высокопольной компоненты спектра к центральной  $h_{-1}/h_0$  (рис. 1). Согласно современным представлениям этот параметр наиболее чувствителен к изменению вязкости окружения спин-радикала [8]. Его величина равна единице для свободного радикала в воде при комнатной температуре и уменьшается по мере его затормаживания.

Для иммобилизованного на пирофосфатазе R-ПХМБ величина  $h_{-1}/h_0$  при pH 6,0 и ионной силе 0,001 составляла 0,25, что соответствует примерно 200-кратному замедлению вращения радикала по сравнению со свободным [8]. При увеличении ионной силы до 0,1 (pH 6,0) подвижность метки возрастала и величина  $h_{-1}/h_0$  составляла 0,55. Это соответствует

примерно 10-кратному растормаживанию спин-радикала по сравнению с тем, что было при ионной силе 0,001. Таким образом, иммобилизация R-ПХМБ на SH-группе неорганической пирофосфатазы позволяет регистрировать локальные структурные изменения белка, происходящие при изменении ионной силы раствора.

Влияние pH на степень затормаживания спин-метки на пирофосфатазе (ионная сила 0,1)

pH	$h_{-1}/h_0$
6,0 (0,1 М буфер пиперазин-этансульфонат-NaOH)	0,55
6,5 То же	0,30
7,0 То же	0,33
8,0 (0,1 М буфер трис-HCl)	0,51

Изменение pH также вызывало изменение подвижности радикала на белке (см. таблицу). Нами был изучен биологически важный интервал значений pH (6,0–8,0) при постоянной ионной силе. Следует отметить, что pH-зависимость подвижности спин-метки очень похожа на аналогичную зависимость термической инактивации этого фермента [3]. Очевидно, перестройки структуры фермента при изменении pH, отражающиеся на степени иммобилизации радикала, влияют и на этот процесс. Область значений pH 6,5–7,0 соответствует наибольшей заторможенности R-ПХМБ. По-видимому, при этом метка находится в наиболее плотном окружении групп поверхности белка в районе ее локализации.

Иммобилизованная на пирофосфатазе спин-метка была охарактеризована также методом парамагнитного зонда путем определения константы скорости релаксации для взаимодействия иминоксильного радикала с феррицианидом калия [9]. Для этого изучали зависимость величины уширения центральной компоненты спектра ЭПР  $\Delta H_0$  от концентрации парамагнетика. Эти величины в условиях эксперимента связаны следующим соотношением:  $\Delta H_0 = 6,5 \cdot 10^{-8} \cdot k_b C$ , где  $C$  — концентрация парамагнетика, М;  $k_b$  — константа скорости обменной релаксации в  $M^{-1} \cdot c^{-1}$  [8]. Опыт проводили при рН 6,5 и ионной силе 1,0; в этих условиях изменение ионной силы при разбавлении не влияло на спектр ЭПР. Результаты титрования спин-меточной пирофосфатазы феррицианидом калия представлены на рис. 2. Величина  $k_b$  составила  $3,7 \cdot 10^8 M^{-1} c^{-1}$ . Для оценки доступности радикала парамагнитному зонду Лихтенштейном и Гребенщиковым [9] был предложен параметр  $\mu = k_a/2 \cdot k_b$ , где  $k_a$  — константа скорости релаксации свободного радикала в воде. Для изученных ими спин-меточных по SH-группе гемоглобина и миоглобина в области рН от 7,0 до 11,0 величина  $\mu$  изменялась в пределах 0,8—2,2; в то же время параметры вращательной диффузии, определяемые приблизительно по величине  $h_{-1}/h_0$  изменялись на 2—3 порядка. Неорганическая пирофосфатаза не является исключением из этого ряда: затормаживание, определенное по  $h_{-1}/h_0$ , составляло при рН 6,0—200, а величина  $\mu$  при рН 6,5 равна 1,65. Такое различие параметров, возможно, обусловлено тем, что внутримолекулярное вращение метки на белке испытывает дополнительные стерические препятствия, которые отсутствуют для ударов зонда [8].

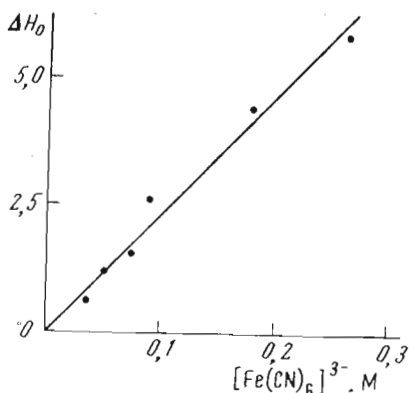


Рис. 2. Зависимость уширения центральной компоненты спектра ЭПР иммобилизованного радикала от концентрации  $K_3[Fe(CN)_6]$  при рН 6,5.

*Влияние лигандов фермента на подвижность метки.* Изучение этого вопроса представляет значительный интерес, поскольку позволяет проследить за конформацией белка при образовании его комплексов, существующих при работе фермента. Поскольку активность пирофосфатазы не изменяется при модификации SH-группы, последняя не входит в состав центров связывания металлов и субстрата, важных для функционирования фермента. Следовательно, трудно ожидать непосредственного влияния лигандов на метку. Поэтому можно связать эффект лигандов на подвижность метки с конформационными изменениями белка.

Из катионов двухвалентных металлов были выбраны три наиболее важных для работы фермента:  $Mg^{2+}$  — активатор гидролиза пирофосфата,  $Zn^{2+}$  — активатор гидролиза АТФ и  $Ca^{2+}$  — ингибитор обоих процессов. Эксперименты с  $Mg^{2+}$  и  $Ca^{2+}$  проводили при рН 8,0, а с  $Zn^{2+}$  — при рН 6,5. Концентрации металлов были насыщающими и составляли 5 мМ [3]. Для количественной характеристики изменения подвижности метки использовали величину  $\alpha = [(h_{-1}/h_0)^* / (h_{-1}/h_0)] - 1$  (индекс \* относится к параметрам спектра в присутствии лиганда).

Величины  $\alpha$  для  $Mg^{2+}$  и  $Ca^{2+}$  были соответственно 0,03 и 0,07. Если учесть, что ошибка определения  $\alpha$  составляла  $\pm 0,03$ , то можно сделать вывод, что эффект этих катионов выражен слабо. Это может быть связано с тем, что эффект указанных катионов — близкодествующий и не распространяется на область локализации спин-метки. Значительный растормаживающий эффект ( $\alpha 0,45$ ) вызывали катионы  $Zn^{2+}$  при рН 6,5, оптимальном для гидролиза АТФ. Особенности этого катиона по сравнению с  $Mg^{2+}$



и  $\text{Ca}^{2+}$  были отмечены при изучении тепловой инактивации пирогосфатазы, когда было обнаружено существование в молекуле белка двух различных центров связывания [3]. Изучение кинетики ферментативной реакции, активируемой цинком, показало, что заполнение центра с меньшим сродством к этому катиону приводит к ингибированию [6]. В условиях данного эксперимента оценить количественно роль каждого центра во влиянии на подвижность спин-метки не удалось, и мы ограничились регистрацией суммарного эффекта двух катионов.

Ранее было установлено, что фермент может связывать пирогосфат в отсутствие катионов металлов [3, 5]. Добавление субстрата до концентрации 1 мМ к спин-меченому белку при рН 8,0 приводило к увеличению подвижности спин-метки ( $\alpha 0,17$ ). В присутствии 5 мМ  $\text{Ca}^{2+}$  значение  $\alpha$  уменьшалось до 0,06 независимо от порядка прибавления  $\text{Ca}^{2+}$  и пирогосфата к спин-меченому белку. Следовательно, можно предполагать, что конформационные состояния комплексов  $\text{E}-\text{Ca}$  и  $\text{E}-\text{Ca}-\text{PP}$ , с одной стороны, и комплекса  $\text{E}-\text{PP}$  — с другой, различны. В таком случае возможная роль металла-активатора заключается в переводе фермента из каталитически неактивной конформации, возникающей при присоединении субстрата, в активную, которая близка конформации двойного комплекса фермент — металл. В случае  $\text{Zn}^{2+}$  изменение структуры белка, вероятно, таково, что фермент приобретает способность достаточно эффективно катализировать гидролиз пирогосфорной связи в АТФ и ухудшает способность гидролизовать пирогосфат.

### Экспериментальная часть

Неорганическую пирогосфатазу выделяли из пекарских дрожжей по методу Купермана и др. [7]. Для удаления примеси пирогосфата его гидролизировали добавлением к раствору фермента 1 мМ  $\text{MgCl}_2$ . Затем фермент (0,45 мМ) инкубировали в течение 1 ч при 20° в 0,1 М буфере трис-НСI (рН 8,5), содержащем 2,2 мМ этилендиаминтетраацетат, и отделяли от низкомолекулярных веществ гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-25. Белок элюировали водой. Электрофорез в полиакриламидном геле обнаруживал одну белковую полосу. Удельная активность препарата составляла 1550 ед.

Р-ПХМБ был синтезирован по описанной методике [11]. В работе использовали буферы, приготовленные на основе триса и пиперазин-N,N-бис(2-этансульфонової кислоты) фирмы «Sigma» (США). Соли двухвалентных металлов, пирогосфата, феррицианида калия и хлористого натрия были квалификации х.ч. и ч.д.а. Все растворы готовили на деионизованной бидистиллированной воде.

Для получения спин-меченой пирогосфатазы к 100 мкл раствора белка в воде (0,3–0,4 мМ) прибавляли 20 мкл 1 М буферного раствора пиперазин-N,N-бис(2-этансульфонової кислоты)-NaOH (рН 7,0) и 10 мкл 10 мМ раствора Р-ПХМБ. Через 30–60 мин избыток реагента удаляли гель-фильтрацией на сефадексе G-25; свободный объем колонки составлял 400 мкл.

В стандартном опыте по изучению свойств спин-меченого фермента в стеклянную ампулу объемом 100 мкл помещали 40 мкл раствора модифицированного белка (~0,2 мМ), 10 мкл 1 М буферного раствора, содержащего NaCl для создания необходимой ионной силы, и 10–50 мкл раствора лиганда. В опыте по зондированию концентрацию парамагнетика постепенно увеличивали при добавлении проб (10 мкл) раствора феррицианида калия. Ампулы при записи спектра термостатировали обдуванием сжатым воздухом с температурой  $15 \pm 1^\circ$ . Спектры регистрировали на приборе ЭПР-3 с мощностью с.в.ч. 80 МВт и разверткой магнитного поля 100 Э. Для определения соотношения метка — белок снимали спектры замороженных растворов (77° К) модифицированного белка и свободной метки.

Измерение ферментативной активности проводили, как было описано ранее [12]. Концентрацию растворов белка определяли спектрофотометрически [13]. Молекулярный вес полагали равным 70 000 [14, 15].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Braga E. A., Awaeva S. M. (1972) FEBS Lett., 27, 251-255.
2. Ridlington J. W., Butler L. G. (1972) J. Biol. Chem., 247, 7303-7307.
3. Шафранский Ю. А., Аваева С. М. (1973) Биохимия, 38, 1248-1254.
4. Höhne W. E., Rapoport T. A. (1973) Eur. J. Biochem., 33, 323-331.
5. Rapoport T. A., Höhne W. E., Heitmann P., Rapoport S. (1973) Eur. J. Biochem., 33, 341-347.
6. Вауков А. А., Аваева С. М. (1974) Eur. J. Biochem., 47, 57-66.
7. Ковальчук О. В., Аваева С. М. (1974) Химия природн. соед., № 3, 389-395.
8. Лихтенштейн Г. И. (1974) Методы спиновых меток в молекулярной биологии, «Наука», М.
9. Лихтенштейн Г. И., Гребенников Ю. Б., Бободжанов П. Х., Коханов Ю. В. (1970) Молекулярн. биология, 4, 682-691.
10. Cooperman B. S., Chiu N. Y., Bruckmann R. H., Bunick G. J., McKenna G. P. (1973) Biochemistry, 12, 1665-1669.
11. Лихтенштейн Г. И., Бободжанов П. Х. (1968) Биофизика, 8, 757-764.
12. Вауков А. А., Аваева С. М. (1973) Eur. J. Biochem., 32, 136-142.
13. Kunitz M. (1952) J. Gen. Physiol., 35, 423-450.
14. Ridlington J. M., Yang J., Butler L. G. (1972) Arch. Biochem. Biophys., 153, 714-725.
15. Hansen G., Eifler R., Heitmann P. (1972) Acta biol. med. germ., 28, 977-987.

Поступила в редакцию  
19.VII.1974

#### THE STUDY OF YEAST INORGANIC PYROPHOSPHATASE PROPERTIES USING THE SPIN-LABELED *p*-CHLOROMERCUROBENZAMIDE

SHAFRANSKY Yu. A., AVAEVA S. M., KOTELNIKOV A. I.

*Laboratory of Bioorganic Chemistry, M. V. Lomonosov State  
University, Moscow; Branch of Institute of Chemical Physics,  
Academy of Sciences of the USSR, Chernogolovka*

By treatment of yeast inorganic pyrophosphatase with N-(1-oxyl-2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidiny)-*p*-chloromercuriobenzamide one residue of the reagent was incorporated into the protein molecule. The analysis of ESR spectrum of the modified protein reveals a lowered mobility of the spin-label. The effect is dependent upon the value of ionic strength, pH and the presence of metal cations and substrate. Of the cations, Zn<sup>2+</sup> causes the greatest increase in mobility, while Mg<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup> are virtually without effect. In the absence of metals pyrophosphate gives rise to a marked enhancement of the label mobility, which disappears on adding Ca<sup>2+</sup>.