



УДК 577.152.361*1'134:577.112.4

**МЕМБРАННАЯ НЕОРГАНИЧЕСКАЯ ПИРОФОСФАТАЗА.
РОЛЬ SH-ГРУПП В ПРОЯВЛЕНИИ ГИДРОЛИТИЧЕСКОЙ
АКТИВНОСТИ***Волк С. Е., Павлов А. Р., Байков А. А.**Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
Межфакультетская проблемная научно-исследовательская
лаборатория молекулярной биологии и биоорганической
химии им. А. Н. Белозерского*

Модификация SH-групп мембранной неорганической пирофосфатазы из митохондрий сердца быка и ее каталитического фрагмента шестью реагентами (ртутьсодержащими соединениями, дисульфидами и малеимидами) уменьшает гидролитическую активность до 2,5–39% от исходной. В молекуле фермента существует не менее трех SH-групп, блокирование которых снижает активность, причем для модификации двух из них характерна отрицательная кооперативность. Общее число SH-групп в молекуле мембранной пирофосфатазы и ее каталитическом фрагменте составляет 24 и 9, из них 18–21 и 4–6 соответственно доступны в нативном состоянии. Результаты показывают, что SH-группы не входят в активный центр мембранной пирофосфатазы, но их модификация сильно влияет на гидролиз PP_i , что может иметь важное значение для функционирования фермента в мембраносвязанном состоянии.

Мембранная неорганическая пирофосфатаза (КФ 3.6.1.1) присутствует в энергосопрягающих мембранах бактерий и митохондрий. Ее принципиальное отличие от неорганической пирофосфатазы, которая находится в гиалоплазме клеток, состоит в способности сопрягать гидролиз и синтез PP_i с изменением градиента электрохимического потенциала иона H^+ в мембране (см. обзоры [1, 2]). Есть основания полагать, что изучение мембранной неорганической пирофосфатазы может дать ценную информацию о механизмах окислительного и фотофосфорилирования.

Ранее в рамках проводимого в нашей лаборатории исследования структурно-функциональных особенностей мембранной формы пирофосфатазы, разработанной ей свойства молекулярного преобразователя энергии, была разработана методика ее выделения в чистом виде из митохондрий сердца быка [3, 4]. При изучении четвертичной структуры было установлено, что молекула этого фермента образована по меньшей мере пятью субъединицами четырех типов и имеет молекулярную массу $\sim 190\,000$ Да [4]. Из матрикса митохондрий была выделена еще одна форма пирофосфатазы (пирофосфатаза I) с молекулярной массой 60 000 Да. Ее молекула состоит из двух субъединиц, идентичных субъединицам мембранной пирофосфатазы, содержащим активные центры [4]. Анализ кинетики гидролиза PP_i мембранной пирофосфатазой показал, что субстратом для нее служит комплекс $Mg^{2+} - PP_i$ и что для ее активности необходимо связывание двух ионов Mg^{2+} на активный центр [5]. Активность пирофосфатаз митохондрий очень сильно ингибируется ионами Ca^{2+} и в меньшей степени фосфатом и АТФ [5]. При гидролизе PP_i в растворе каталитические субъединицы мембранного фермента функционируют практически независимо от остальной части молекулы [4, 5].

Механизм гидролиза и синтеза фосфоангидридной связи мембранной пирофосфатазой, равно, как и другими ферментами, пока неизвестен. Наибольший прогресс в этом отношении достигнут для пирофосфатазы гиало-

Сокращения: ПХМБ – *n*-хлормеркурибензоат, ДДФМ – 4-диметиламино-3,5-динитрофенилмалеимид, ДТНБ – 5,5'-дитиобис(2-нитробензоат).

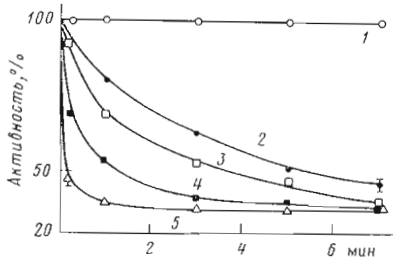


Рис. 1

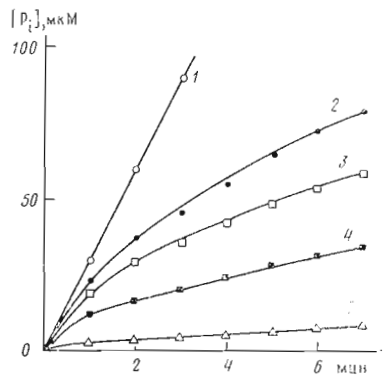


Рис. 2

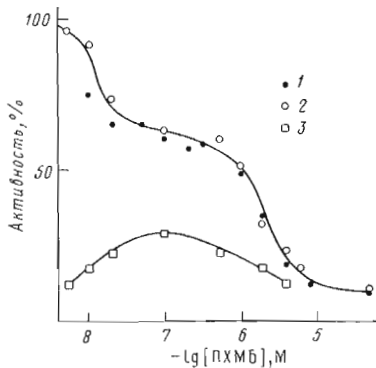


Рис. 3

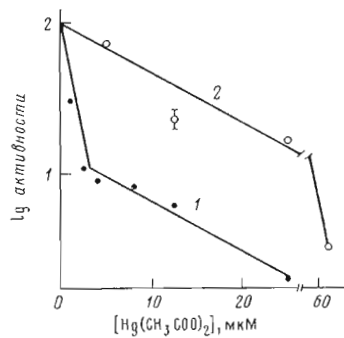


Рис. 4

Рис. 1. Влияние N-этилмалеимида на кинетику гидролиза PP_i пирофосфатазой I. Концентрации N-этилмалеимида (мМ): 1 - 0; 2 - 0,07; 3 - 0,14; 4 - 0,4; 5 - 1,0

Рис. 2. Влияние $Hg(CH_3COO)_2$ на кинетику гидролиза PP_i мембранной пирофосфатазой. Концентрация белка 0,15 мкг/мл. Концентрация $Hg(CH_3COO)_2$ (мкМ): 1 - 0; 2 - 0,46; 3 - 1,36; 4 - 1,7; 5 - 25

Рис. 3. Зависимость активности мембранной пирофосфатазы I (1) и пирофосфатазы II (2, 3) в равновесии от концентрации ПХМБ в отсутствие (1, 2) и в присутствии (3) 0,1 мМ ДДФМ. Концентрация белка 0,8 мМ

Рис. 4. Зависимость активности пирофосфатазы I в равновесии от концентрации $Hg(CH_3COO)_2$. 1 - нативный фермент, 2 - фермент, преинкубированный 5 мин с 0,4 мМ N-этилмалеимидом. Активности нативного и модифицированного фермента приняты за 100%

плазмы дрожжей, для которой химическим [6-10] и рентгенографическим [11] методами в активном центре обнаружены остатки Arg, Tyr, Lys, Glu и Asp. Для мембранной пирофосфатазы таких данных нет, но вполне вероятно, что в формировании ее активного центра участвуют эти же аминокислоты. Кроме них для ее работы в качестве преобразователя энергии, вероятно, требуются дополнительные функциональные группы, образующие устройство для энергетического сопряжения, которое отсутствует у упомянутой пирофосфатазы дрожжей. В этой связи интересно, что митохондриальные пирофосфатазы быстро теряют активность в отсутствие SH-соединений, на основании чего предполагается наличие у них каталитически важной SH-группы [3, 4, 12]. Большинство других пирофосфатаз нечувствительны к SH-реагентам или ингибируются ими незначительно, как, например, пирофосфатаза дрожжей [13]. Для того чтобы с помощью химической модификации определить роль тех или иных аминокислотных остатков мембранной пирофосфатазы, необходимо исследовать, как при этом изменяются скорости гидролиза и синтеза PP_i в растворе и в энергизованной и неэнергизованной мембранах. Настоящее сообщение посвящено изучению роли SH-групп мембранной пирофосфатазы в проявлении

ею гидролитической активности в растворенном состоянии. Другие аспекты модификации остатков Cys мембранной пирогосфатазы будут рассмотрены в последующих публикациях.

Кинетика инактивации. Для изучения влияния SH-реагентов на ферментативную активность были использованы два методических подхода. В случае малеимидов, образующих с белком прочную связь, ферменты преинкубировали с ними нужное время, нейтрализовали избыток реагента дитиоэритритом и затем прибавляли субстрат (PP_1) и соль магния, без которой пирогосфатаза неактивна. Образование P_1 в результате ферментативной реакции происходило линейно во времени, и скорость этого процесса характеризовала остаточную активность ферментов. На рис. 1 представлена кинетика инактивации пирогосфатазы I N-этилмалеимидом. Остаточная активность фермента составляла $\sim 40\%$ независимо от концентрации реагента и не снижалась при повторном его прибавлении. Реакция мембранной пирогосфатазы с этим соединением протекала сходным образом. Экспериментальные кривые удовлетворительно спрямлялись в координатах $\lg[(a-a_\infty)/(a_0-a_\infty)]$ от t (a_0 , a и a_∞ — активности в моменты времени 0, t и ∞ соответственно), из чего следует, что инактивация подчиняется кинетике псевдопервого порядка. Величина константы скорости псевдопервого порядка (k^1) линейно зависела от концентрации N-этилмалеимида. Величина константы скорости второго порядка (k^{II}) для мембранной пирогосфатазы и ее каталитического фрагмента (пирогосфатазы I) была одинаковой в пределах ошибки определения и составляла $6000 \text{ M}^{-1} \text{ мин}^{-1}$. Качественно похожие результаты были получены при использовании ингибитора 4-диметиламино-3,5-динитрофенилмалеимида (ДДФМ). Инактивацию под действием дисульфидов 5,5'-дитиобис(2-нитробензоата) (ДТНБ) и 2,2'-дипиридилдисульфида изучали аналогичным образом, но не прибавляли дитиоэритрит, так как он разрушает связь ингибитор — белок и восстанавливает ферментативную активность.

Инактивацию пирогосфатаз *n*-хлормеркурибензоатом (ПХМБ) и $\text{Hg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ измеряли непосредственно в ходе гидролиза PP_1 без предварительной инкубации ферментов с ингибиторами. На рис. 2 приведены кривые накопления P_1 для мембранной пирогосфатазы в присутствии нескольких концентраций соли ртути. Без ингибитора гидролиз PP_1 происходил с постоянной скоростью, тогда как в присутствии $\text{Hg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ скорость постепенно снижалась до некоторого постоянного, отличного от нуля значения. Такие же кривые были получены с ПХМБ и $\text{Hg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ для обеих пирогосфатаз. Математическую обработку кривых с целью определения k^1 проводили так, как описано ранее для инактивации пирогосфатазы фторидом [14]. Величины k^1 линейно зависели от концентрации ингибиторов. На рис. 3 представлены зависимости конечных величин активностей мембранной пирогосфатазы и пирогосфатазы I после установления равновесия с ПХМБ от концентрации ингибитора (кривые 1 и 2). Как видно, эти зависимости практически одинаковы для двух пирогосфатаз. Характер зависимостей указывает на существование двух типов SH-групп с различной реакционной способностью. Более реакционноспособные группы модифицировались почти полностью при 10^{-7} M ПХМБ, и активность падала при этом на 40%. Для блокирования группы второго типа требовалось 10^{-5} – 10^{-4} M ПХМБ, и в результате активность снижалась еще на 50%. Кривая модификации пирогосфатазы I солью ртути также обнаруживала существование двух типов реагирующих центров (рис. 4, 1).

Количественные характеристики реакций мембранной пирогосфатазы и пирогосфатазы I с SH-реагентами приведены в табл. 1. Величины остаточных активностей были измерены при высоких концентрациях реагентов. Критерием полноты модификации служило то, что дальнейшее увеличение их концентраций вдвое не изменяло активность ферментов. Константы скорости второго порядка для реакций белков с ингибиторами (k^{II}) были рассчитаны по константам k^1 , измеренным при меньших концентрациях ингибиторов. В пределах экспериментальной ошибки ($\pm 30\%$) значения были одинаковы для двух пирогосфатаз.

Параметры инактивации пирофосфатаз

Реагент	Концентрация, мМ	Остаточная активность, %		k _{II} , мМ ⁻¹ ·мин ⁻¹
		пирофосфатазы I	мембранной пирофосфатазы	
—		100	100	—
Hg(CH ₃ COO) ₂	0,025	2,5±1,2	3,8±1,5	1100
ПХМБ	0,05	8,8±1,0	10,0±1,5	1600
N-Этилмалеимид	1	39,0±1,0	34,0±1,0	4
ДДФМ	0,5	2,5±1,5		3.
2,2'-Дипиридилдисульфид	1	8,8±1,2	9,0±1,5	
ДТНБ	1	3,5±0,5	7,5±0,5	

Анализируя табл. 1, можно заметить две важные закономерности: 1) данные, полученные для мембранного фермента в целом и его каталитической части — пирофосфатазы I, существенно не различаются. Это значит, что важные для активности SH-группы находятся только в каталитических субъединицах мембранной пирофосфатазы; 2) ни один из реагентов не уменьшает активность до нуля, хотя, как отмечалось выше, концентрация SH-реагентов и времена реакции достаточны для полной модификации доступных групп. Величина остаточной активности сильно зависит от природы реагента и изменяется в пределах 2,5–39%. Рассмотрению причин этого посвящен следующий раздел работы. Наблюдаемая степень инактивации пирофосфатаз SH-реагентами не зависела от концентрации РР₁ при определении активности. Следовательно, причиной инактивации является снижение только каталитической константы, но не константы Михаэлиса.

Инактивация двумя реагентами. Различие в остаточной активности пирофосфатаз, модифицированных разными реагентами, могло быть следствием того, что центры модификации для разных реагентов не совпадают, по крайней мере частично. Для проверки этой возможности было изучено влияние ПХМБ, 2,2'-дипиридилдисульфида и Hg(CH₃COO)₂ на пирофосфатазу I, обработанную 0,4–1 мМ N-этилмалеимидом в течение 5 мин и потерявшую в результате этого 59% активности. ПХМБ в концентрации 50 мкМ и дипиридилдисульфид в концентрации 1 мМ не влияли на активность пирофосфатазы I, алкилированной N-этилмалеимидом, тогда как в нативном ферменте эти реагенты снижали активность более чем в 10 раз (табл. 1). Вдвое большая концентрация ПХМБ снижала активность с 41 до 30%. Соль ртути в концентрации до 5 мкМ практически не влияла на активность фермента, модифицированного N-этилмалеимидом (рис. 4), хотя активность нативной пирофосфатазы снижалась под действием 5 мкМ Hg(CH₃COO)₂ почти в 10 раз. При больших концентрациях соли ртути наблюдалась значительная инактивация фермента, обработанного N-этилмалеимидом. На белок, модифицированный 0,1 мМ ДДФМ, ртутные соединения влияли так же.

Неполная защита N-этилмалеимидом от ртутных соединений могла иметь две наиболее вероятные причины: модификацию ртутными соединениями групп, недоступных для N-этилмалеимида, и конкуренцию ртутных соединений с ионами Mg²⁺, участвующими в катализе. Для проверки активности фермента, алкилированного N-этилмалеимидом, была измерена в присутствии 25 мкМ Hg(CH₃COO)₂ при концентрациях MgCl₂ 4 и 10 мМ. При увеличении концентрации соли магния активность фермента, модифицированного двумя реагентами, возрастала в 2,6 раза. Активность фермента, обработанного только N-этилмалеимидом, при этом не изменялась. Эти результаты указывают на то, что дополнительная инактивация при высоких концентрациях соединений ртути происходит из-за конкуренции с ионами Mg²⁺ за субстрат или центры присоединения металла на ферменте [5]. В экспериментах с обратным порядком прибавления реагентов

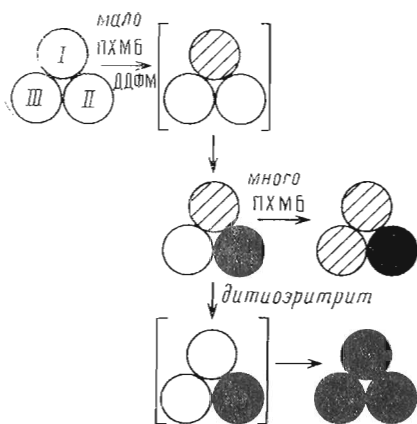


Схема реакции SH-групп молекулы пиррофосфатазы I с ДДФМ в присутствии ПХМБ. Свободные, заштрихованные и зачерненные кружки соответствуют свободным SH-группам и модифицированным ПХМБ и ДДФМ соответственно. Квадратные скобки обозначают промежуточные неравновесные состояния

N-этилмаленимид не влиял на активность пиррофосфатазы I, модифицированной 5 мкМ $\text{Hg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ или 1 мМ 2,2'-дипиридилдисульфида.

На основании этих данных можно заключить, что дисульфиды и маленимиды реагируют с одними и теми же SH-группами мембранной пиррофосфатазы. Эти же группы модифицируются ртутными соединениями, но последние, кроме того, способны при высокой концентрации вытеснять ионы Mg^{2+} из фермент-субстратного комплекса.

Следующая серия опытов обнаружила взаимовлияние SH-групп при их модификации. В этих опытах изучали одновременную модификацию пиррофосфатазы I под действием ДДФМ и ПХМБ. Наблюдение за степенью инактивации проводили так, как описано для ртутных соединений, т. е. прибавляли оба реагента непосредственно в систему для измерения ферментативной активности. Концентрация ДДФМ составляла 0,1 мМ во всех опытах. В отсутствие ПХМБ активность фермента снижалась под действием ДДФМ за 30 с до 6% от исходной и далее не изменялась при прибавлении 0,01–3,2 мкМ ПХМБ или 16–1000 мкМ дителиозитрита. Если же ПХМБ присутствовал при реакции фермента с ДДФМ, то в определенном диапазоне его концентраций наблюдался защитный эффект (рис. 3, 3). При концентрации ПХМБ 0,1 мкМ активность пиррофосфатазы падала под действием ДДФМ лишь до 28%. Таким образом, при совместном действии двух ингибиторов активность снижается меньше, чем для одного из них в отдельности. Прибавление 3,2 мкМ ПХМБ к ферменту, обработанному ДДФМ в присутствии 0,1 мкМ ПХМБ, снижало активность от 28 до 8,3%. Это означает, что часть SH-групп не затрагивается ДДФМ в присутствии малого количества ПХМБ, хотя в отсутствие ПХМБ они блокируются, как отмечено выше. Интересно, что дителиозитрит, используемый обычно для стабилизации SH-зависимых ферментов, в концентрации 16 мкМ также уменьшал активность пиррофосфатазы I, модифицированной смесью ДДФМ и ПХМБ, от 28 до 13%. Необычное поведение дитиола можно объяснить тем, что он удаляет ПХМБ с занятых им SH-групп, в результате чего они затем модифицируются присутствующим в системе ДДФМ. Существенно, что концентрация SH-групп дителиозитрита в этом опыте была меньше концентрации ДДФМ.

Согласно минимальной схеме, объясняющей все приведенные выше данные, в молекуле пиррофосфатазы есть три SH-группы, блокирование которых сказывается на активности. Одна из этих групп (она обладает наибольшим сродством к ртутным соединениям) быстро реагирует с ПХМБ при добавлении смеси 0,1 мкМ ПХМБ и 0,1 мМ ДДФМ и таким образом защищается от алкилирования. Из двух других групп, модификация которых требует большей концентрации ПХМБ (рис. 3, 1 и 2), одна вступает в реакцию с ДДФМ. Третья группа остается при этом свободной, так как иначе нельзя объяснить последующее ингибирование под действием 3,2 мкМ ПХМБ. Главной особенностью схемы является то, что ПХМБ, связываясь с группой I, изменяет реакционную способность группы III и предотвращает ее реакцию с ДДФМ. Следует подчеркнуть, что

Содержание сульфгидрильных групп в митохондриальных пиррофосфатазах

Цифры без скобок — нативные ферменты,
цифры в скобках — ферменты,
денатурированные 6 М гидрохлоридом гуанидина

Реагент	Содержание SH-групп, моль/моль	
	Пиррофосфатаза I	Мембранная пиррофосфатаза
[³ H]N-Этилмалеимид	4,2±0,5	20,8±1,5
ДТНБ	6,5±0,2(8,6±0,2)	17,5±0,2(23,8±0,2)

описанная схема является минимальной в том смысле, что действительное число SH-групп может быть большим. Кроме того, мы предполагаем, что оба реагента модифицируют все три SH-группы, хотя возможна более сложная ситуация, при которой ПХМБ модифицирует только группы I и III, а ДДФМ — группы II и III. В любом случае необходимо допустить, что блокирование части групп ПХМБ защищает свободные группы от реакции с ДДФМ.

Влияние специфических лигандов фермента. Присутствие ионов Mg^{2+} (4 мМ) или PP_i (1 мМ) по отдельности в среде инкубации не изменяло кинетику инактивации пиррофосфатаз N-этилмалеимидом. Взятые вместе ионы Mg^{2+} и PP_i снижали k^{11} в 3,3 раза, не влияя на величину остаточной активности. Известно, что PP_i образует с ионами Mg^{2+} комплекс $Mg-PP_i$, который связывается в активном центре пиррофосфатазы. Вероятнее всего, это и объясняет наблюдаемый эффект.

Фосфат (трисовая соль) в концентрации 10 мМ в 2,5 раза увеличивал константу скорости реакции мембранной пиррофосфатазы с 0,1 мМ ДТНБ.

Содержание SH-групп в пиррофосфатазах. Для измерения количеств SH-групп в ферментах были использованы радиоактивный N-этилмалеимид и ДТНБ. Ферменты брали в нативном состоянии и после денатурации действием 6 М гидрохлорида гуанидина (в случае ДТНБ). Это позволило оценить общее число SH-групп и ту часть из них, которая модифицируется в нативном белке. Результаты измерений суммированы в табл. 2. Всего в мембранной пиррофосфатазе обнаружены 24 SH-группы, из которых лишь девять находятся в каталитических субъединицах (пиррофосфатаза I). Основная часть групп (18—21) доступна модификации в нативном ферменте и, следовательно, экспонирована в раствор. В нативной пиррофосфатазе I модифицируются четыре — шесть SH-группы, которые, по всей видимости, и влияют на активность. Эти данные согласуются с количеством SH-групп, обнаруженных при изучении инактивации фермента.

Заключение. Полученные данные в совокупности позволяют утверждать, что SH-группы не входят в активный центр мембранной пиррофосфатазы. Это следует из того, что активность модифицированного фермента зависит от природы реагента и не равна нулю. Можно предположить два механизма влияния модификации SH-групп на активность пиррофосфатазы. Согласно одному из них SH-группы находятся около активного центра, так что остаток реагента, связанный с белком, стерически препятствует каталитическому акту. По другому механизму уменьшение активности происходит в результате изменения структуры белка (третичной или четвертичной), косвенным образом сказывающегося на протекании каталитического акта. Второй механизм представляется более вероятным, так как ион Hg^{2+} , имеющий самый малый размер, влияет сильнее других реагентов.

Опыты по одновременной модификации пиррофосфатазы двумя реагентами обнаружили сильное взаимовлияние SH-групп в пределах одной молекулы фермента. Это взаимодействие проявляется в том, что ПХМБ, присоединяясь к одной из SH-групп белка, препятствует реакции свобод-

ных групп с ДДФМ. По-видимому, реакция групп II и III с ПХМБ также затрудняется, поскольку они модифицируются им лишь при высокой концентрации (3,2 мкМ). Причина этого может заключаться в том, что SH-группы I и II пространственно сближены, или в том, что блокирование группы I изменяет конформацию белка.

В настоящей работе не проводилась идентификация функциональных групп белка, реагирующих с использованными реагентами. Однако не вызывает сомнения, что модификации подвергались сульфгидрильные группы. Исключение составляют центры, модифицируемые при высокой концентрации ртутных соединений в ферменте, алкилированном малеимидами. Тот факт, что Hg^{2+} и ПХМБ могут реагировать в белках не только с SH-группами, уже отмечался ранее [15]. В нашем случае это также весьма вероятно, поскольку эти центры не реагируют с S—S-соединениями и малеимидами.

Возникает вопрос: каким образом SH-группы участвуют в функционировании мембранной пиррофосфатазы? Во-первых, SH-группы могут быть частью механизма преобразования химической энергии, заключенной в молекуле PP_1 , в разность электрохимических потенциалов ионов H^+ в мембране [1, 2]. В этом случае можно ожидать, что модификация SH-групп будет сказываться на гидролизе PP_1 , являющемся элементом полного цикла работы фермента в мембране, но не блокировать его полностью, так как в растворе гидролиз PP_1 вряд ли лимитируется переносом протона. Олескин и Самуилов [16] предполагают, что SH-группы мембранной пиррофосфатазы *R. rubrum*, модификация которых снижает гидролитическую активность фермента [17] и способность образовывать разность потенциалов на мембране [16], участвуют в сопряженном переносе протонов через мембрану хромофоров.

Во-вторых, SH-группы могут участвовать в регуляции активности фермента в митохондриях. Возможность участия SH-групп в регуляции самых разнообразных функций мембранных белков довольно широко обсуждается в последнее время. Здесь уместно упомянуть гипотезы Робилларда и Кониингса [18] и Гилберта [19], в которых образованию S—S-связей в результате реакции SH-групп белков между собой или с глутатионом отводится ключевая роль в обеспечении нужной активности мембранных белков-катализаторов *in vivo*. Не исключено, что регуляция метаболизма PP_1 в митохондриях на уровне мембранной пиррофосфатазы также основана на этом принципе, так как образование дисульфида с участием сульфгидрильной группы белка резко снижает его активность.

Экспериментальная часть

В работе использовали буферные вещества, пиррофосфат натрия и дитиоэритрит (Sigma, США), ДТНБ и ДДФМ (Serva, ФРГ), 2,2'-дипиридилдисульфид (Fluka, Швейцария), N-этилмалеимид (BDH, Англия), ПХМБ (Chemapol, СССР), DEAE-сефарозу (Pharmacia, Швеция) и меченный тритием N-этилмалеимид (New England Nuclear, США). Остальные реактивы были отечественного производства.

Мембранную неорганическую пиррофосфатазу и ее каталитический фрагмент (пиррофосфатазу I) с уд. акт. 43 и 190 МЕ/мг соответственно выделяли из митохондрий сердца быка по описанной ранее методике [4]. Чистота препаратов, по данным электрофореза в полиакриламидном геле, была не менее 90%. Для отделения дитиоэритрита, прибавлявшегося при выделении для стабилизации активности, растворы пиррофосфата подвергали двукратной гель-фильтрации на колонке с сефадексом G-50. Критерием полноты отделения дитиоэритрита служило то, что проведение гель-фильтрации в третий раз не влияло на степень инактивации ферментов низкими концентрациями ртутных соединений и не снижало количество определяемых SH-групп. Концентрацию белковых растворов измеряли спектрофотометрически, полагая величины $E_{280}^{0,1\%}$ равными 0,91 и 1,56 для мембранной пиррофосфатазы и пиррофосфатазы I соответственно. Эти

значения коэффициентов экстинкции определили по связыванию красителя кумасси голубого G-250 [20], используя в качестве стандарта альбумин сыворотки быка.

Ферментативный гидролиз PP_1 регистрировали непрерывным методом с помощью автоматического анализатора фосфата [21] при 25° С в среде объемом 5 мл следующего состава: 0,05 М трис-НСl (рН 8,0), 4 мМ $MgCl_2$, 1 мМ PP_1 , 0,1 мМ этиленгликоль-бис(β -аминоэтил- N,N' -тетраацетат) и 0,02 МЕ фермента.

$Hg(CH_3COO)_2$ и ПХМБ прибавляли в эту смесь перед ферментами. В случае малеимидов ферменты преинкубировали с ними указанное время в этой же среде, но в отсутствие $MgCl_2$ и PP_1 , прибавляли 5 мМ дитиозеритрит для удаления избытков SH-реагентов и затем начинали ферментативную реакцию внесением $MgCl_2$ и PP_1 . Для измерения инактивации дисульфидами ферменты в концентрации 0,07–0,4 мг/мл инкубировали с ними при 25° С в 0,2 мл 0,05 М трис-НСl (рН 8,0) и отбирали во времени аликвоты для измерения активности в среде указанного выше состава.

Содержание SH-групп в белках определяли с помощью ДТНБ по методу Эллмана [22] при концентрации белков 0,25–0,40 мг/мл. Реакцию с меченым тритием N-этилмалеимидом проводили в 0,25 мл 0,02 М буфера оксиэтилпиперазинэтилсульфонат – КОН (рН 7,5), содержавшего 0,1 М КСl и 0,01 мМ этиленгликоль-бис(β -аминоэтил- N,N' -тетраацетат), при концентрации белка 0,2 мг/мл. Меченый N-этилмалеимид (500 имп/нмоль) прибавляли в концентрации 1 мМ и инкубировали смесь 1 ч при 25° С. Затем раствор разбавляли в 10 раз 0,05 М буфером трис-НСl (рН 7,5), содержавшим 5 мМ дитиозеритрит, и адсорбировали белок на колонке размером 0,5×6 см с DEAE-сефарозой при 4° С. Не связанную с белком метку удаляли промыванием колонки 70 мл 0,05 М трис-НСl (рН 7,5) до исчезновения 3H в элюате, после чего белок элюировали 1 мл 1М NaCl в этом же буфере.

Каждое измерение повторяли не менее 2 раз и рассчитывали среднее значение \pm среднее отклонение.

Авторы выражают глубокую благодарность проф. С. М. Аваевой за интерес к работе и полезное обсуждение.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Baltscheffsky M.* In: Photosynthetic phosphorylation in the photosynthetic bacteria / Eds Clayton R. K., Sistrom W. R. N. Y.: Plenum Press, 1978, p. 595–613.
2. *Мансурова С. Э.* Успехи микробиол., 1982, т. 17, № 1, с. 3–28.
3. *Ефремович Н. В., Волк С. Е., Байков А. А., Шахов Ю. А.* Биохимия, 1980, т. 45, № 6, с. 1033–1040.
4. *Volk S. E., Kostenko E. B., Baykov A. A., Avaeva S. M.* Biochim. et biophys. acta, 1983, v. 744, № 2, p. 127–134.
5. *Volk S. E., Baykov A. A., Duzhenko V. S., Avaeva S. M.* Eur. J. Biochem., 1982, v. 125, № 1, p. 215–220.
6. *Cooperman B. S., Chiu N. Y.* Biochemistry, 1973, v. 12, № 9, p. 1676–1682.
7. *Heitmann P., Moellerke G., Uhlig H. J.* Acta biol. et med. Germ., 1972, v. 29, № 4/5, p. 551–560.
8. *Heitmann P., Uhlig H. J.* Acta biol. et med. Germ., 1974, v. 32, № 6, p. 565–574.
9. *Финк Н. Ю., Назарова Т. И., Аваева С. М.* Химия природн. соедин., 1975, № 2, с. 235–240.
10. *Avaeva S. M., Bakuleva N. P., Baratova L. A., Nazarova T. I., Fink N. Ju.* Biochim. et biophys. acta, 1977, v. 482, № 1, p. 173–184.
11. *Курапова И. П., Терзян С. С., Воропова А. А., Смирнова Е. А., Вайнштейн Б. К., Хёне В., Хансен Г.* Биоорг. химия, 1983, т. 9, № 12, с. 1611–1619.
12. *Irie M., Yabuta A., Kimura K., Shindo Y., Tomita K. J.* Biochem., 1970, v. 67, № 1, p. 47–53.
13. *Байков А. А., Краснова В. И., Аваева С. М.* Биоорг. химия, 1982, т. 8, № 2, с. 195–199.
14. *Baykov A. A., Artjukov A. A., Avaeva S. M.* Biochim. et biophys. acta, 1976, v. 429, № 3, p. 982–992.
15. *Горчинский Ю. М.* Сера в белках. М.: Наука, 1977, с. 44–45.
16. *Олескин А. В., Самуилов В. Д.* Биохимия, 1983, т. 48, № 5, с. 797–801.
17. *Randahl H.* Eur. J. Biochem., 1979, v. 102, № 1, p. 251–256.
18. *Robillard G. T., Konings W. N.* Eur. J. Biochem., 1982, v. 127, № 3, p. 597–604.
19. *Gilbert H. F. J.* Biol. Chem., 1982, v. 257, № 20, p. 12086–12091.
20. *Bradford M. M.* Anal. Biochem., 1976, v. 72, № 1, p. 248–254.

21. Baykov A. A., Azaeva S. M. *Anal. Biochem.*, 1981, v. 116, № 1, p. 1-4.
22. Ellmann G. L. *Arch. Biochem. and Biophys.*, 1959, v. 82, № 1, p. 70-77.

Поступила в редакцию:
6.VII.1983

**MEMBRANE INORGANIC PYROPHOSPHATASE.
THE ROLE OF SH-GROUPS IN HYDROLYTIC ACTIVITY**

VOLK S. E., PAVLOV A. R., BAYKOV A. A.

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

Modification of SH-groups in the membraneous inorganic pyrophosphatase of beef heart mitochondria and its catalytic part with 6 reagents (mercurials, S-S compounds and maleimides) decreases the hydrolytic activity to 2,5-39% of the original level. There are at least 3 SH-groups whose blockage diminishes the activity, modification of 2 of them being characterized by negative cooperativity. The membraneous pyrophosphatase and its catalytic subunit contain in total 24 and 9 SH-groups, respectively, of which 18-21 and 4-6 are accessible in the native state. The results indicate that the SH-groups are not involved in the active site of the membraneous inorganic pyrophosphatase, but their modification strongly affects PP_i hydrolysis which may be crucial for enzyme functioning in the membrane-bound state.