



УДК 577.152.361.1'134:577.112.4

**ФУНКЦИОНАЛЬНО ВАЖНЫЙ ОСТАТОК ЛИЗИНА
В НЕОРГАНИЧЕСКОЙ ПИРОФОСФАТАЗЕ ИЗ *E. COLI*****II. ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА МОДИФИЦИРОВАННОГО
ТРИПТИЧЕСКОГО ПЕПТИДА И ИССЛЕДОВАНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ
РОЛИ ОСТАТКА ЛИЗИНА,
КОНТРОЛИРУЮЩЕГО ФЕРМЕНТАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ****Комиссаров А. А., Склянкина В. А., Аваева С. М.**

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

Инактивация неорганической пирофосфатазы из *E. coli* пиридоксаль-5'-фосфатом связана с модификацией остатка лизина, расположенного в триптическом пептиде, имеющем N-концевую последовательность Asp-Leu-Pro-Glu. В процессе функционирования фермента этот остаток лизина, по-видимому, находится в протонированном состоянии и либо является донором протона для продукта ферментативной реакции, либо участвует в стабилизации переходного состояния.

Ранее было установлено [1], что пиридоксаль-5'-фосфат селективно модифицирует один из 16 остатков лизина в субъединице неорганической пирофосфатазы (КФ 3.6.1.1) из *E. coli*. При этом модифицированная молекула полностью теряет способность гидролизовать субстрат. Образовавшееся основание Шиффа относительно неустойчиво, и с целью использования этой реакции для выделения модифицированного пептида в настоящей работе проводили восстановление альдимина в пиридоксамин с помощью боргидрида натрия. Использование $\text{NaB}[^3\text{H}]_4$ позволяет ввести радиоактивный зонд в остаток ингибитора.

Неорганическую пирофосфатазу инактивировали на 70% и добавляли в реакционную смесь меченый боргидрид натрия. По завершении реакции восстановления (исчезновение желтой окраски) низкомолекулярные вещества отделяли гель-фильтрацией, белок сушили лиофильно и вновь хроматографировали на сефадексе G-50 (рис. 1). Видно, что белок, выходящий со свободным объемом колонки, радиоактивен и поглощает при 325 нм. Спектр поглощения вещества, находящегося в этой фракции, совпадает со спектром модифицированной неорганической пирофосфатазы. Степень включения ингибитора в фермент, рассчитанная из соотношения поглощений при 280 и 325 нм, составила 1,4 остатка пиридоксамина на субъединицу белка.

Модифицированный фермент гидролизовали трипсином, полученные пептиды разделяли с помощью ВЭЖХ на полупрепаративной колонке с обращенной фазой C_8 Ultrasphere Ocutyl (рис. 2а). Фракции, поглощающие при 254 и 325 нм, собирали и определяли в них радиоактивность.

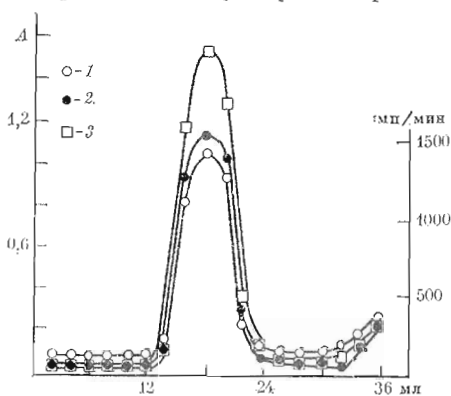


Рис. 1. Гель-хроматография неорганической пирофосфатазы из *E. coli*, модифицированной пиридоксаль-5'-фосфатом и восстановленной $\text{NaB}[^3\text{H}]_4$. Контроль по радиоактивности (1) и по поглощению при 325 (2) и 280 нм (3)

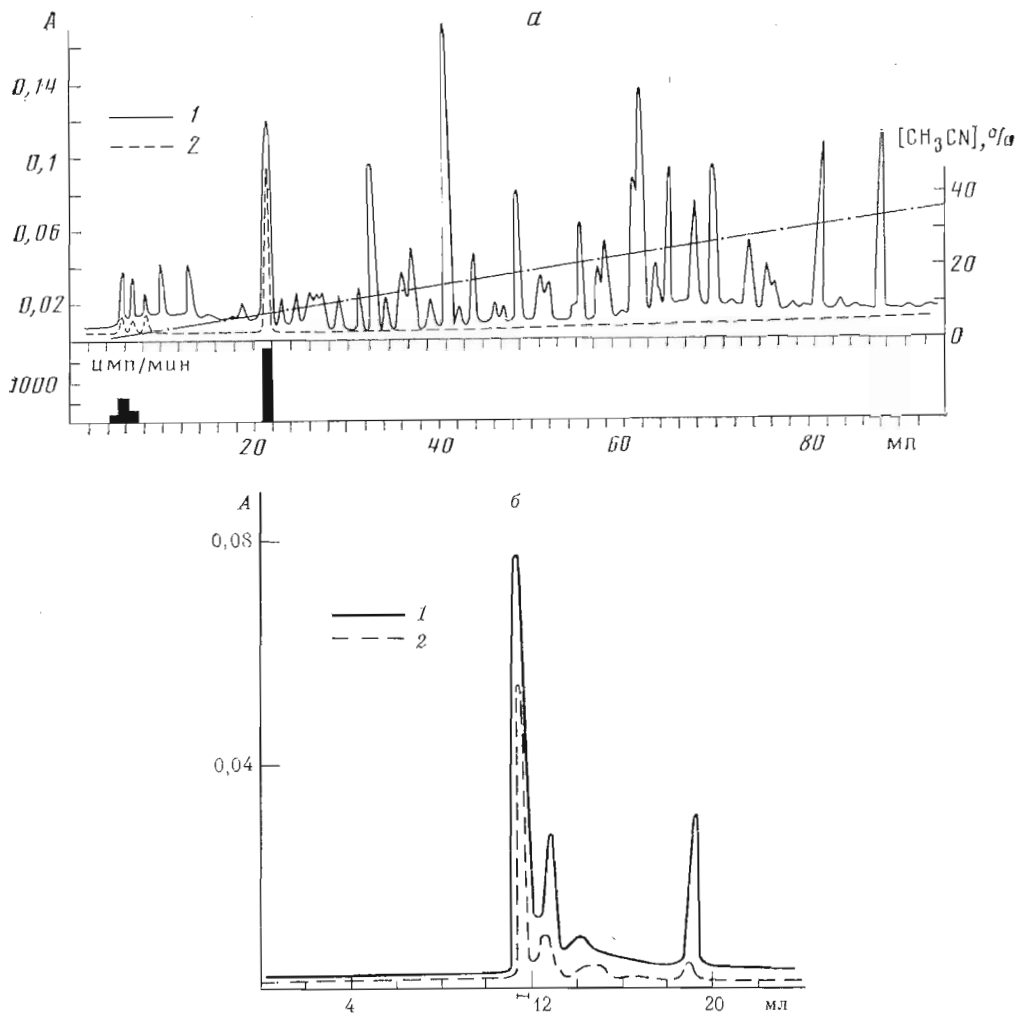


Рис. 2. Разделение пептидов триптического гидролизата (а) модифицированной неорганической пирофосфатазы на колонке Ultrasphere Octyl в градиенте ацетонитрила в $2 \cdot 10^{-2}$ М фосфатном буфере, рН 6,6. Контроль по поглощению при 254 (1) и 325 нм (2) и по радиоактивности. Реchromатография меченого пептида (б) на колонке с TSK-гелем SW-2000 в $2 \cdot 10^{-2}$ М фосфатном буфере, рН 6,8. Контроль по поглощению при 254 (1) и 325 нм (2). Показаны границы объединения фракции, содержащей меченый пептид

На хроматограмме имеется единственный пик, который можно отнести к пептиду, содержащему модифицированный остаток лизина, поскольку только в этом пике совпадают радиоактивность и поглощение при 254 и 325 нм.

Вследствие того что трипсин не способен расщеплять пептидную связь, образуемую пиридоксильлизинном, полученный фрагмент представляет собой двойной триптический пептид неорганической пирофосфатазы, содержащий один модифицированный и один свободный (на С-конце) остаток лизина.

Попытки очистить выделенный пептид с помощью ВЭЖХ на той же колонке в градиенте концентрации ацетонитрила в 0,1% трифторуксусной кислоте были неудачными. Это, вероятно, можно объяснить тем, что при низком значении рН возрастает гидрофобность пептида за счет протонирования и уменьшается его растворимость в элюенте. В пользу предположения о прочной сорбции модифицированного пептида на носителе свидетельствует ухудшение хроматографических характеристик (эффективность, селективность) использованной для разделения колонки.

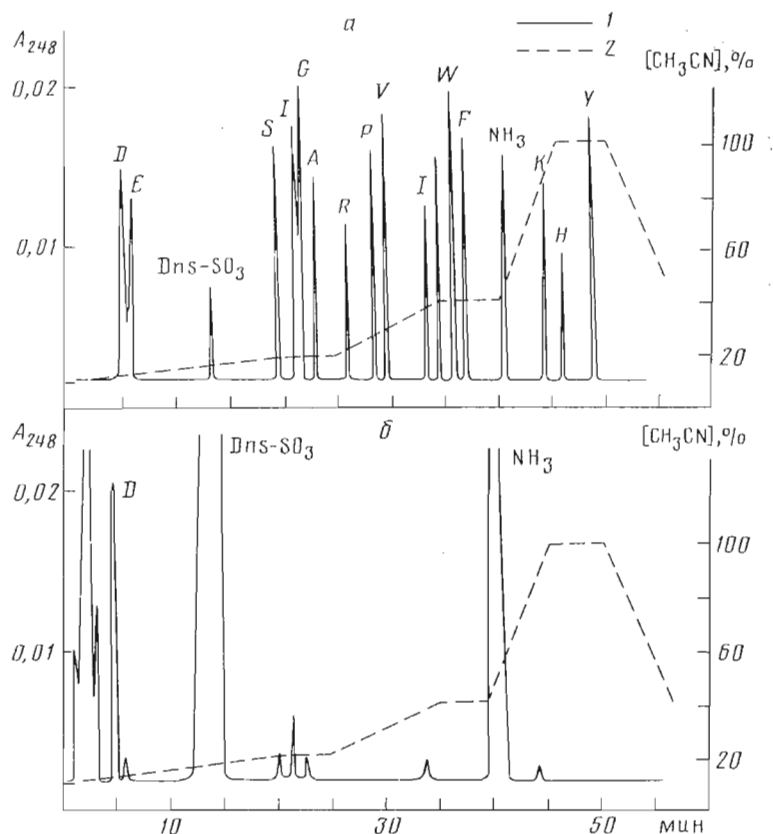


Рис. 3. Хроматография стандартной смеси Dns-аминокислот (а) и кислотного гидролизата дансильированного модифицированного пептида (б) на колонке Ultrasphere ODS в градиенте ацетонитрила в $3 \cdot 10^{-2}$ М фосфатном буфере, pH 6,8; 48° С. 1 — поглощение при 248 нм, 2 — содержание CH_3CN

Очистить пептид удалось, проводя рехроматографию на колонке с TSK-гелем SW-2000 в фосфатном буфере, pH 6,6 (рис. 2б). Основной пик, поглощающий при 325 и 254 нм, содержит фрагмент с молекулярной массой 2500–3500, что позволяет оценить длину модифицированного пептида в 20–30 аминокислотных остатков.

Для проверки гомогенности пептида проводили определение N-концевого аминокислотного остатка. Пептид дансильировали, гидролизовали 6 н. HCl и разделяли гидролизат с помощью ВЭЖХ на аналитической колонке C_{18} Ultrasphere ODS. Из сравнения хроматограмм, полученных для стандартной смеси дансил (Dns)-аминокислот и анализируемого образца (рис. 3а, б), можно сделать вывод, что пептид гомогенен и имеет на N-коце остаток Asp или Asn. Контролем в этом эксперименте служила аликуота элюата, отобранная из фракции, выходящей при рехроматографии непосредственно перед модифицированным пептидом (рис. 2б). Ее также обрабатывали дансилхлоридом, HCl и гидролизат разделяли в тех же условиях. На полученной хроматограмме отсутствовал пик Dns-Asp, а в остальном она была идентична хроматограмме, представленной на рис. 3б.

Аминокислотный состав выделенного пептида представлен в табл. 1. Можно предположить, что пептид состоит из 23–27 аминокислотных остатков, и это согласуется с результатами гель-хроматографии (рис. 2б). N-Концевая последовательность пептида определена ступенчатой деградацией по Эдману [2]. Отщепленные фенилтиогидантоины аминокислот идентифицировали по времени выхода на колонке с обращенной фазой C_{18} . Полученные результаты показывают, что N-концевая последовательность модифицированного пептида — Asp-Leu-Pro-Glu. После установ-

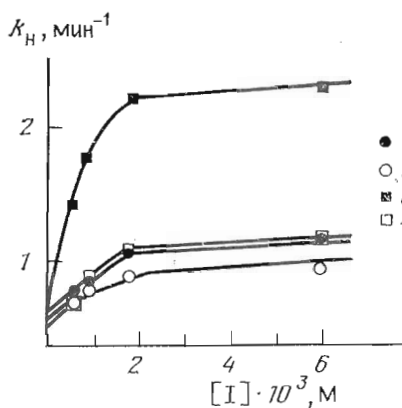


Рис. 4

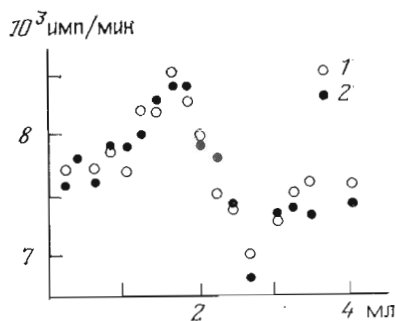


Рис. 5

Рис. 4. Зависимость наблюдаемой константы скорости ингибации неорганической пирофосфатазы пиродоксаль-5'-фосфатом от концентрации ингибитора при pH 9 (3), 10 (4), 7 (2), 6 (1); температура 28° С

Рис. 5. Равновесная гель-хроматография модифицированного (1) и нативного (2) фермента на сефадексе G-50, уравновешенном $5 \cdot 10^{-5}$ М $[^{32}\text{P}]$ пирофосфатом натрия и 10^{-3} М хлоридом кальция в 0,1 М трис-НСI-буфере, pH 8,5

ления первичной структуры неорганической пирофосфатазы из *E. coli* локализация этого остатка не составит труда.

При функционировании фермента ϵ -аминогруппа остатка лизина может находиться либо в депротонированном, либо в протонированном состоянии. В первом случае лизин может быть лигандом металла-активатора или акцептором протона, во втором — участвовать в связывании субстрата, быть донором протона для уходящей фосфатной группы или своим положительным зарядом стабилизировать переходное состояние при превращении субстрата в продукты реакции.

Полученная зависимость константы скорости первого порядка реакции модификации (k_n) [1] от pH (рис. 4) показывает, что с повышением pH скорость реакции растет, достигая максимальной величины при pH 9. Это позволяет предположить, что в интервале pH от 6 до 9 аминогруппа лизина находится в протонированном состоянии. Уменьшение k_n при pH выше 9 связано, по-видимому, со снижением в реакционной среде концентрации протонов, необходимых для образования основания Шиффа.

Для выяснения возможной роли остатка лизина, подвергающегося модификации, в функционировании фермента изучено, с одной стороны, влияние ионов металла-активатора на инактивацию, а с другой — взаимодействие модифицированного фермента с ионами Mg^{2+} , Ca^{2+} и аналогом субстрата — пирофосфатом кальция.

Известно, что в субъединице неорганической пирофосфатазы из *E. coli* имеются два центра связывания ионов металла-активатора, константы диссоциации для которых составляют 40 и $4 \cdot 10^{-5}$ М при pH 9 [3]. Для того чтобы определить, не является ли модифицируемый остаток лизина

Таблица 1

Аминокислотный состав модифицированного пептида, выделенного из трихического гидролизата неорганической пирофосфатазы

Аминокислота	Число остатков	Аминокислота	Число остатков
Asp	6,5	Val	1,7
Thr	1,0	Ile	2,3
Ser	1,2	Leu	1,0
Glu	5,0	Tyr	1,2
Pro	2,0	Lys	1,0
Ala	2,5	N ⁶ -Пиродоксимлизин	1,0

Связывание ионов кальция и пирофосфата кальция нативной и модифицированной неорганической пирофосфатазой из *E. coli*

Концентрация добавленного лиганда, мМ		Концентрация фермента, мкМ		Содержание ионов кальция, г·ион/моль субъединицы фермента		Содержание ионов пирофосфата, г·ион/моль субъединицы фермента	
CaCl ₂	Na ₂ P ₂ O ₇	нативный	модифицированный	нативный	модифицированный	нативный	модифицированный
				0,1	—	10	10
0,1	—	10	10	0,9	2,2	—	—
1,5	—	100	100	1,5	2,6	—	—
0,1	0,05	10	10	1,8	3,0	—	—
0,1	0,05	10	10	1,7	3,2	—	—
1,0	0,05	10	10	—	—	1,5	1,5

лигандом иона металла, изучали влияние на инактивацию фермента добавления в реакционную смесь возрастающих концентраций Mg²⁺. Защитного эффекта не наблюдалось при изменении концентрации MgSO₄ от 10⁻⁶ до 10⁻² М.

Ранее было показано, что заполнение ионами магния центра высокого сродства на ферменте приводит к появлению разностных УФ-спектров [3]. Это свойство использовано для сравнения нативной и инактивированной пиродоксаль-5'-фосфатом неорганической пирофосфатазы. Оказалось, что при титровании раствором MgCl₂ образцов нативного и модифицированного фермента возникают сходные разностные УФ-спектры, из которых рассчитаны одинаковые константы диссоциации комплекса фермент—ион металла. Таким образом, модифицированный фермент полностью сохраняет способность связывать ион металла в центре высокого сродства.

Для определения числа ионов металла, способных присоединиться к молекуле модифицированного фермента, проводили равновесную гель-фильтрацию на колонке, уравновешенной [⁴⁵Ca]Cl₂ в концентрациях от 10⁻⁴ до 1,5·10⁻³ М. Параллельно в аналогичных условиях проводили гель-фильтрацию нативного фермента (табл. 2). Полученные результаты свидетельствуют о том, что неактивный белок полностью сохраняет способность связывать ионы Ca²⁺. Способность же модифицированной пирофосфатазы в большей степени, чем нативный фермент, связывать ионы Ca²⁺ можно объяснить присоединением Ca²⁺ к остатку ингибитора. Поскольку центры связывания ионов Ca²⁺ и Mg²⁺, вероятно, совпадают [3], можно заключить, что модификация не отражается на способности фермента присоединять ионы металла-активатора. Таким образом, представляется маловероятным, что блокируемый остаток лизина является лигандом иона металла, что согласуется с выводом, полученным из опытов по влиянию ионов Mg²⁺ на реакцию инактивации. Действительно, для того чтобы лизин мог выступать в роли лиганда, он должен был бы находиться в депротонированном состоянии.

Для определения способности модифицированного фермента взаимодействовать с субстратом проводили равновесную гель-хроматографию на колонке, уравновешенной ³²P- или ⁴⁵Ca-меченым пирофосфатом кальция — аналогом субстрата неорганической пирофосфатазы. Из результатов, приведенных на рис. 5 и в табл. 2, видно, что нативный и инактивированный ферменты связывают одинаковое количество пирофосфата кальция.

Таким образом, полученные результаты позволяют предположить, что модифицируемый остаток лизина не участвует в связывании ни металла-активатора, ни субстрата. При функционировании фермента он находится в протонированном состоянии и, вероятно, важен для каталитической стадии гидролиза пирофосфата. Здесь он может либо стабилизировать переходное состояние, либо являться донором протона для уходящей фосфатной группы, образующейся после расщепления фосфоангидридной связи.

Экспериментальная часть

В работе использованы Dns-аминокислоты, веронал (Reanal, Венгрия), сефадекс G-50, тонкий (Pharmacia, Швеция), ацетонитрил (Merck, ФРГ). Пиридоксаль-5'-фосфат (Reanal, Венгрия) перед использованием очищали ионообменной хроматографией на колонке с дауэком 1×4 (Serva, ФРГ). Остальные реактивы были отечественного производства квалификации ос.ч. п.х.ч.

Неорганическая пирофосфатаза с активностью 600 МЕ/мг при 25°С выделена из штамма *E. coli* MRE-600 по методике [4]; ферментативную активность определяли на автоматическом анализаторе фосфата [5].

В работе использовали [⁴⁵Ca]Cl₂ без носителя (уд. акт. 20–40 МБк/мл), [³²P]пирофосфат натрия (уд. акт. 50 ГБк/моль) и [³H]боргидрид натрия (уд. акт. 500 ГБк/моль) отечественного производства.

Содержание ³²P в образцах определяли в воде, а ⁴⁵Ca и ³H – в диоксановом сцинтилляторе с использованием жидкостно-сцинтилляционных счетчиков Ultrabeta (LKB, Швеция) и Delta-300 (Tracor, США).

Все растворы готовили на дважды деионизованной воде. Буферные растворы для жидкостной хроматографии готовили на бидистиллированной воде и пропускали через колонку (12×250 мм), заполненную смолой Silasorb C₁₈ (размер частиц 10–15 мкм; Chemapol, Чехословакия).

Получение модифицированного фермента. К 5 мл 2·10⁻⁵ М раствора фермента в 0,1 М вероналовом буфере, pH 9, при 28°С добавляли пиридоксаль-5'-фосфат до концентрации 5·10⁻³ М. За ходом инактивации следили, измеряя ферментативную активность. После достижения максимального падения активности в реакционную смесь добавляли NaB[³H]₄ до концентрации 2·10⁻³ М. Через 30 мин реакционную смесь напосили на колонку (1×75 см) с сефадексом G-50 (тонкий), уравновешенным 0,01 М NH₄HCO₃, промывали тем же буфером, собирая фракции по 0,8 мл. Фракции, соответствующие белковому пикну, объединяли, высушивали лиофильно и повторяли гель-хроматографию. Во фракциях измеряли поглощение при 280 и 325 нм и радиоактивность, отбирая аликваты по 50 мкл.

Триптический гидролиз модифицированного фермента. Модифицированный белок лиофилизировали, растворяли в 0,01 М NH₄HCO₃ до концентрации 15 мг/мл, добавляли уксусную кислоту до концентрации 0,05 М и кипятили 15 мин на водяной бане, после чего увеличивали концентрацию NH₄HCO₃ до 0,15 М. К полученному раствору белка (10 мг/мл, pH 7,8) добавляли трипсин (2% по весу от содержания пирофосфатазы) и инкубировали смесь 4 ч при 37°С, добавляя через 2 ч после начала инкубации еще 2% трипсина. После окончания реакции смесь кипятили 10 мин на водяной бане.

Разделение пептидов осуществляли с помощью жидкостного хроматографа, модель 332 (Beckman, США) на полупрепаративной колонке (10×250 мм) C₈ Ultrasphere Octyl с обращенной фазой (Beckman, США), размер частиц 5 мкм. Для элюции использовали 2·10⁻² М фосфатный буфер, pH 6,6. Скорость подачи элюента 2 мл/мин. За выходом пептидов с колонки следили спектрофотометрически по поглощению растворов при 254 и 325 нм. В собранных фракциях определяли радиоактивность. Радиоактивные фракции, поглощающие при 325 нм, объединяли и концентрировали в вакууме. Рехроматографию пептида проводили на колонке (10×600 мм) с TSK-телем SW-2000 (Toyo-Soda, Япония) в 2·10⁻² М фосфатном буфере, pH 6,8; скорость элюции 0,3 мл/мин. Фракцию, поглощающую при 325 нм, высушивали лиофильно.

Определение N-концевой аминокислоты. Пептид дансильировали и гидролизировали как описано в работе [2]. Продукты гидролиза или контрольную смесь Dns-аминокислот разделяли ВЭЖХ (колонка Ultrasphere ODS (4,6×250 мм), размер частиц 5 мкм; хроматограф, модель 332 (Beckman, США); градиент ацетонитрила в 3·10⁻² М фосфатном буфере, pH 6,8; 48°С) (рис. 3). За выходом Dns-аминокислот следили по поглощению при 248 и 254 нм.

Аминокислотный состав пептида определяли на аминокислотном анализаторе 835 (Hitachi, Япония) после кислотного гидролиза (6 н. HCl, 105°С, 24 ч).

Ступенчатую деградацию пептида по методу Эдмана проводили вручную, идентифицируя фенилтиогидантоины аминокислот по времени выхо-

да при ВЭЖХ на колонке Ultrasphere ODS (размер частиц 5 мкм; Beckman, США).

Инактивация пирофосфатазы под действием пиридоксаль-5'-фосфата в присутствии ионов магния. Фермент (10^{-7} М) инкубировали при 25°C в 0,05 М вероналовом буфере, рН 9, содержащем $5 \cdot 10^{-3}$ М ингибитор и 10^{-6} – 10^{-2} М сернистый магний. За ходом инактивации следили, отбирая через определенные промежутки времени (0–20 мин) аликваты, в которых определяли активность фермента.

Дифференциальные УФ-спектры модифицированного и нативного фермента при титровании их ионами магния снимали как в работе [3].

Равновесная гель-хроматография. 100 мкл реакционной смеси, содержащей модифицированную неорганическую пирофосфатазу (10 – $100 \cdot 10^{-6}$ М) и а) $[^{45}\text{Ca}]\text{Cl}_2$ (10^{-4} – $1,5 \cdot 10^{-3}$ М); б) 10^{-3} М $[^{45}\text{Ca}]\text{Cl}_2$ и $5 \cdot 10^{-5}$ М пирофосфат натрия или в) 10^{-3} М CaCl_2 и $5 \cdot 10^{-5}$ М $[^{32}\text{P}]$ пирофосфат натрия, наносили на колонку (0,75×15 см) с сефадексом G-50 (тонкий), уравновешенным трис-НСI-буфером (рН 8,5) с соответствующими добавками (а–в), собирали фракции по 150 мкл. Во фракциях определяли содержание белка и радиоактивность. В качестве контрольного эксперимента в тех же условиях проводили гель-фильтрацию нативного фермента.

Авторы выражают искреннюю благодарность сотрудникам отдела хроматографии Межфакультетской проблемной научно-исследовательской лаборатории молекулярной биологии и биоорганической химии им. А. Н. Белозерского МГУ за проведение аминокислотного анализа и определение N-концевой последовательности пептида.

ЛИТЕРАТУРА

1. Комиссаров А. А., Шпанченко О. В., Склякина В. А., Аваева С. М. // Биоорг. химия. 1987. Т. 13. № 5. С. 592–598.
2. Дэвени Т., Гергей Я. Аминокислоты, пептиды и белки. М.: Мир, 1976. С. 274–281.
3. Курилова С. А., Назарова Т. И., Аваева С. М. // Биоорг. химия. 1983. Т. 9. № 8. С. 1032–1039.
4. Wong S. C. K., Hall D. C., Josse J. // J. Biol. Chem. 1970. V. 245. № 17. P. 4335–4345.
5. Baykov A. A., Avayeva S. M. // Eur. J. Biochem. 1973. V. 32. № 1. P. 132–142.

Поступила в редакцию

21.VII.1986

После доработки

11.XI.1986

A FUNCTIONALLY SIGNIFICANT RESIDUE OF LYSIN IN INORGANIC PYROPHOSPHATASE FROM *E. COLI*. II. ISOLATION OF THE MODIFIED TRYPTIC PEPTIDE AND ITS CHARACTERISTICS; INVESTIGATION OF THE FUNCTIONAL ROLE OF THE LYSIN RESIDUE CONTROLLING THE ENZYMATIC ACTIVITY

KOMISSAROV A. A., SKLYANKINA V. A., AVAYEVA S. M.

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

Inactivation of inorganic pyrophosphatase from *E. coli* by pyridoxal-5'-phosphate is due to the modification of a lysine residue located in the tryptic peptide with the Asp-Leu-Pro-Glu N-terminal sequence. In course of the enzymatic process this lysine residue appears to be in the protonated state and either operators as the proton donor for the product of the enzymatic reaction or is involved in stabilization of the transition state.