



УДК 577.153.35.04

ПОЛУЧЕНИЕ ПРЕПАРАТОВ НЕОРГАНИЧЕСКОЙ ПИРОФOSФАТАЗЫ С МОДИФИЦИРОВАННЫМИ АКТИВНЫМИ И «РЕГУЛЯТОРНЫМИ» ЦЕНТРАМИ

*Водовозова Е. Л., Воробьева Н. П., Комиссаров А. А.,
Назарова Т. П., Аваева С. М.*

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,

*Межфакультетская проблемная научно-исследовательская лаборатория
молекулярной биологии и биоорганической химии им. А. Н. Белозерского*

Разработан метод необратимой селективной модификации активных и «регуляторных» центров неорганической пирофосфатазы дрожжей, основанный на реакции фермента с гидроксиламином. Ингибирование пирофосфатазы 0,1 М NH_2OH приводит к препарату с модифицированными активными центрами, а реакция фосфорилированного белка с 2 М NH_2OH в 40% диметилсульфоксиде — к ферменту с закрытыми «регуляторными» центрами. Получены доказательства строения полученных производных пирофосфатазы.

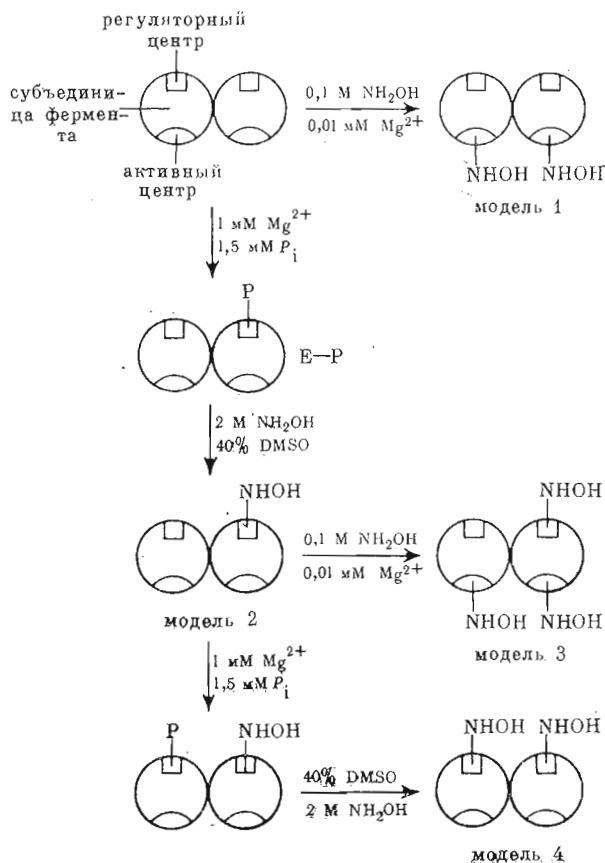
Неорганическая пирофосфатаза дрожжей (КФ 3.6.1.1) катализирует гидролиз фосфоангидридной связи в пирофосфате, триполифосфате и моноэфирах этих кислот [1—3]. При взаимодействии фермента с продуктом ферментативной реакции, фосфатом, образуется фосфорилированный фермент. Акцептором фосфата является β -карбоксийная группа аспарагиновой кислоты, находящаяся в центре, отличном от активного, который далее будет условно называться регуляторным [4]. В пирофосфатазе, состоящей из двух субъединиц, имеют место сильные кооперативные взаимодействия «регуляторных» и активных центров, которые проявляются как в реакциях с аффинными ингибиторами [5—7], так и с фосфатом. Фермент имеет два центра связывания фосфата, но в димере они взаимодействуют таким образом, что только одна субъединица образует с фосфатом устойчивую связь. Заполнение «регуляторных» центров в свою очередь изменяет поведение активных центров [8].

Роль «регуляторных» центров не ясна, и для установления их функции необходимо получить производные фермента с избирательно закрытыми активными и «регуляторными» центрами.

Мы разработали метод модификации активных и «регуляторных» центров пирофосфатазы и получили следующие производные (см. схему): модель 1 — два активных центра закрыты, два «регуляторных» свободны; модель 2 — один «регуляторный» центр закрыт, остальные центры открыты; модель 3 — свободен только один «регуляторный» центр, все остальные закрыты; модель 4 — два «регуляторных» центра закрыты, два активных открыты.

В качестве реагента для получения моделей пирофосфатазы с закрытыми активными и «регуляторными» центрами был выбран гидроксиламин. Прежде всего необходимо было получить фермент с модифицированными активными центрами (схема, модель 1). Ранее было установлено, что при взаимодействии пирофосфатазы с 0,1 М гидроксиламином в присутствии 0,01 мМ Mg^{2+} быстро происходит полное и необратимое ингибирование [9]. Фермент вводили в реакцию с гидроксиламином и после инактивации отделяли от избытка реагентов гель-фильтрацией. Для доказательства того, что в этих условиях действительно получено производное с закрытыми активными центрами, использовали реакцию ингибированного фермента с неорганическим фосфатом при двух концентрациях: 1,5 и 15 мМ, т. е. в условиях, при которых, как было найдено ранее, в первом случае про-

Получение производных пирофосфатазы с модифицированными активными и «регуляторными» центрами



исходит фосфорилирование «регуляторного» центра, во втором — синтез пирофосфата в активных центрах [10]. Так как связь с фосфатом в «регуляторном» центре одной из субъединиц в составе димера лабильна и разрушается при выделении, для получения фермента, содержащего 2 моль P_i /моль, необходимо перед выделением денатурировать фосфорилированный фермент добавлением додецилсульфата натрия до концентрации 0,05%. Результаты опытов по фосфорилированию ингибированной гидроксиламином пирофосфатазы и по синтезу пирофосфата в ее активных центрах суммированы в таблице.

Из приведенных данных следует, что ингибирование пирофосфатазы гидроксиламином не сказывается на фосфорилировании «регуляторных» центров, синтез же пирофосфата в активных центрах уменьшается пропорционально падению активности фермента. Следовательно, в этих условиях действительно получена модель 1 с закрытыми активными центрами.

Далее стояла задача получения пирофосфатазы с закрытым «регуляторным» центром (схема, модель 2). Для этого использовали способность ацилфосфатов образовывать гидроксамовые кислоты в реакции с гидроксиламином [11]. Фосфорилированный по «регуляторному» центру фермент получали взаимодействием с фосфатом в присутствии ионов магния. Выделенный гель-фильтрацией фосфорилированный фермент (E-P) содержал 1 моль P_i на 1 моль фермента. Однако взаимодействие фосфорилированного фермента с гидроксиламином в водных растворах не приводит к образованию гидроксамата, вероятно, вследствие недоступности ацилфос-

Поведение ингибированного гидроксиламино фермента (модель 1) в реакциях фосфорилирования* и синтеза пирофосфата

Степень ингибирования, %	Связывание P_i , моль/моль Е		Синтез PP_i моль/моль Е
	А	Б	
0	1	2	2
50	1	2	1
100	1	2	0

* Выделение фосфорилированного фермента без предварительной денатурации додецилсульфатом натрия (А) и с денатурацией (Б).

фатной связи в этих условиях действовало нуклеофильного агента. В последующих опытах реакцию препарата Е-Р с 2 М гидроксиламино проводили в присутствии 40% диметилсульфоксида. За ходом реакции следили по убыли фосфата в фосфорилированном ферменте. За 50 мин при 30° С происходит практически полное дефосфорилирование Е-Р под действием гидроксиламина. Ферментативная активность в ходе реакции упала на 20%, однако аналогичное снижение активности наблюдалось и в контрольном эксперименте, содержащем вместо гидроксиламина хлористый калий.

Следует отметить, что в условиях высоких концентраций гидроксиламина или ионов магния удается избежать взаимодействия с гидроксиламино активных центров фермента [4]. Поэтому образец Е-Р обрабатывали гидроксиламино с высокой концентрацией, а выделение модифицированного гидроксиламино фермента проводили диализом с последующей гель-фильтрацией в присутствии 5 мМ $MgCl_2$, чтобы избежать ингибирования пирофосфатазы гидроксиламино при снижении его концентрации в процессе выделения [4].

Чтобы проверить, действительно ли была получена модель пирофосфатазы с закрытым «регуляторным» центром, было проведено ее фосфорилирование. Полученное соединение вводили в реакцию с ^{32}P -меченым фосфатом. Оказалось, что такой фермент включает 1 моль P_i как при выделении Е-Р без денатурации, так и при гель-фильтрации после денатурации белка додецилсульфатом натрия. Таким образом, в результате реакции препарата Е-Р с 2 М гидроксиламино в 40% диметилсульфоксиде получена пирофосфатаза, закрытая гидроксиламино по одному «регуляторному» центру (модель 2). Свободный «регуляторный» центр такого фермента можно профосфорилировать с образованием достаточно прочной связи между фосфатом и белком.

Полученное соединение служило исходным для получения фермента, в котором закрыты два активных и один «регуляторный» центр (модель 3), и фермента, в котором закрыты оба «регуляторных» центра, а активные центры свободны (модель 4).

Модель 3 получали обработкой фермента с закрытым «регуляторным» центром 0,1 М гидроксиламино в присутствии 0,01 мМ $MgCl_2$ и выделяли гель-фильтрацией. Фермент с двумя закрытыми «регуляторными» центрами (модель 4) получали из модели 2, фосфорилированной по второму «регуляторному» центру, реакцией с 2 М гидроксиламино в 40% диметилсульфоксиде. Строение полученного соединения было доказано двумя методами: во-первых, модифицированный фермент не вступал в реакцию с фосфатом; во-вторых, модификация «регуляторных» центров элиминировала реактивирующее действие EDTA на неактивный фермент-субстратный комплекс, которое происходит за счет связывания полианионов в «регуляторных» центрах пирофосфатазы [12]. Разработанный метод получения препаратов неорганической пирофосфатазы с закрытыми активными или «регуляторными» центрами открывает широкие возможности для выяснения взаимосвязи этих центров в молекуле фермента, роли «регуляторных» центров в его функционировании, а также дает возможность локализации групп активного и «регуляторного» центров.

Экспериментальная часть

Гомогенный препарат неорганической пирофосфатазы из пекарских дрожжей был получен по методу Брага и др. [13] и имел активность 600 ME.

Радиоактивная фосфорная кислота без носителя (Amersham, Англия) имела удельную радиоактивность 5–20 мКи/мл. Солянокислый гидроксид магния был дважды перекристаллизован из этанола.

Ферментативную активность определяли по скорости отщепления ортофосфата из пирофосфата на автоматическом анализаторе фосфата [14]. Радиоактивность ^{32}P определяли по Черенкову на жидкостно-сцинтилляционном счетчике «Mark-I» или «Mark-II» (Nuclear Chicago, США).

Фосфорилированную неорганическую пирофосфатазу получали выдерживанием 10–18 мкМ раствора фермента в 0,05 М трис- HCl -буфере, содержащем 5 мМ MgCl_2 , с 1,5 мМ NaNH_2 [^{32}P] O_4 (0,02 мКи/пмоль) в течение нескольких минут и отделяли избыток фосфата гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-50. В некоторых случаях перед гель-фильтрацией денатурировали фермент добавлением додецилсульфата натрия до концентрации 0,05%.

Синтез пирофосфата в активном центре фермента вели согласно [10].

Ингибирование фермента гидроксиламином проводили в соответствии с методикой [9], а пирофосфатом магния в присутствии фторида — по [15].

Реактивацию с помощью EDTA осуществляли по методике [12].

Получение фермента с модифицированными «регуляторными» центрами (модель 4). Реакционная смесь в 0,05 М трис- HCl -буфере, pH 7,2, с 40% диметилсульфоксидом содержала 18 мкМ фосфорилированный фермент и 2 М гидроксиламин. Реакцию вели 50 мин при 30°С. Избыток реагента удаляли диализом против буфера, содержащего 5 мМ MgCl_2 , с последующей гель-фильтрацией центрифугированием на микроколонке объемом 5 мл по методу Пенсфского [16]. Модифицированный фермент фосфорилировали как описано выше и вновь вводили в реакцию с гидроксиламином по описанной методике.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ridlington J. W., Butler L. G. J. Biol. Chem., 1972, v. 247, № 22, p. 7303–7307.
2. Höhne W. E., Heilman P. Acta biol. med. Germ., 1974, v. 33, № 1, p. 1–14.
3. Schlesinger M. G., Coon M. G. Biochim. et biophys. acta, 1960, v. 41, № 1, p. 30–36.
4. Аваева С. М., Бакулева Н. П., Баратова Л. А., Назарова Т. И., Финк Н. Ю. Biochim. et biophys. acta, 1977, v. 482, № 1, p. 173–184.
5. Аваева С. М., Диков М. М., Кузнецов А. В., Склянкина В. А. Биоорганическая химия, 1977, т. 3, № 7, с. 934–949.
6. Кузнецов А. В., Склянкина В. А., Аваева С. М. Биоорганическая химия, 1978, т. 4, № 7, с. 984–986.
7. Кузнецов А. В., Склянкина В. А., Аваева С. М. Биоорганическая химия, 1979, т. 5, № 9, с. 1396–1403.
8. Аваева С. М., Байков А. А., Бакулева Н. П., Кашо В. Н., Мельник М. С., Назарова Т. И. Тез. докл. 6-й объединенный симпозиум биохимических обществ ГДР и СССР «Регуляция в метаболизме и биоэнергетике», 1981, Таллин, с. 101.
9. Аваева С. М., Воробьева Н. И., Мельник М. С., Назарова Т. И. Биоорганическая химия, 1979, т. 5, № 10, с. 1570–1578.
10. Bakuleva N. P., Nazarova T. I., Baykov A. A., Awaeva S. M. FEBS Lett., 1981, v. 124, № 2, p. 245–247.
11. Lippmann F., Tuttle L. C. J. Biol. Chem., 1945, v. 159, № 1, p. 21–28.
12. Бакулева Н. П., Костенко Е. Б., Байков А. А., Аваева С. М. Биохимия, 1981, т. 46, № 5, с. 832–840.
13. Брага Э. А., Байков А. А., Аваева С. М. Биохимия, 1973, т. 38, № 2, с. 344–350.
14. Baykov A. A., Awaeva S. M. Eur. J. Biochem., 1973, v. 32, № 1, p. 136–142.
15. Baykov A. A., Bakuleva N. P., Nazarova T. I., Awaeva S. M. Biochim. et biophys. acta, 1977, v. 481, № 1, p. 184–194.
16. Penefsky H. J. Biol. Chem., 1977, v. 252, № 9, p. 2891–2899.

Поступила в редакцию 28.VII.1981

INORGANIC PYROPHOSPHATASE PREPARATIONS WITH MODIFIED ACTIVE AND «REGULATORY» CENTERS

VODOVOZOVA E. L., VOROB'YEVA N. N., KOMISSAROV A. A., NAZAROVA T. I., AWAIEVA S. M.

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

A method for irreversibly selective modification of active and «regulatory» centers in yeast inorganic pyrophosphatase has been worked out which involves the enzyme reaction with hydroxylamine. Treatment of pyrophosphatase with 0,1 M NH_2OH yields a preparation with modified active centers, while the reaction of phosphorylated enzyme with 2 M NH_2OH in 40% dimethylsulfoxide gives an enzyme with blocked «regulatory» centers. The structure of the resultant pyrophosphatase derivatives is confirmed.