



УДК 577.153.35.02

ЗНАЧЕНИЕ ЧЕТВЕРТИЧНОЙ СТРУКТУРЫ НЕОРГАНИЧЕСКОЙ ПИРОФОСФАТАЗЫ ИЗ ДРОЖЖЕЙ ДЛЯ ЕЕ АФФИННОГО ИНГИБИРОВАНИЯ

*Плаксина Е. А., Солопанова Е. Ю., Связто И. Е.,
Склянкина В. А., Аваева С. М.*

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

Проведено сравнительное изучение поведения мономерной и димерной форм неорганической пирофосфатазы в реакциях с аффинными реагентами. Установлено, что и мономер и димер способны связывать реагенты в активном центре, но только в случае димера наступает необратимая инактивация фермента. Сродство мономерной формы фермента к субстрату и ингибиторам в 4–6 раз ниже, чем сродство димерной формы. На основании полученных данных сделан вывод, что образование четвертичной структуры увеличивает сродство к реагентам и является необходимым для протекания необратимого аффинного ингибирования.

Изучение роли четвертичной структуры ферментов в их функционировании представляет одну из актуальных проблем современной энзимологии. Неорганическая пирофосфатаза из пекарских дрожжей, катализирующая гидролиз неорганического пирофосфата, является олигомерным ферментом, молекула которого состоит из двух химически идентичных субъединиц. Субъединица и димер обладают равными удельными активностями; следовательно, четвертичная структура не является необходимой для катализа [1]. В то же время в ряде реакций фермента субъединицы ведут себя по-разному. Это особенно ярко проявляется при взаимодействии с аффинными ингибиторами — моноэфирами фосфорной кислоты. Метилфосфат и фосфогликолевая кислота необратимо инактивируют только одну из субъединиц [2]. Ингибирование фосфоэтанололамином [3] и N-хлорацетилфосфоэтанололамином [4] является полным. Но и в этих случаях субъединицы реагируют не одинаково — с разными скоростями и с образованием различных продуктов модификации [3]. Полученные данные позволили нам высказать предположение о взаимном влиянии субъединиц в молекуле пирофосфатазы.

Прямое экспериментальное подтверждение этому получено в настоящей работе, в которой проведено сравнительное изучение поведения субъединицы и димерной формы фермента в реакции с моноэфирами фосфорной кислоты и продемонстрирована необходимость четвертичной структуры для протекания аффинного ингибирования.

Субъединицу фермента получали в иммобилизованном виде диссоциацией пирофосфатазы, ковалентно присоединенной к сефарозе за счет ϵ -NH₂-группы остатка лизина [1]. Свойства субъединицы сравнивали со свойствами иммобилизованного димера в реакции с метилфосфатом, O-фосфоэтанол- и O-фосфопропаполаминами и N-хлорацетилфосфоэтанололамином.

Во всех случаях ингибирование иммобилизованного димера проходило аналогично ингибированию нативного фермента: действие метилфосфата вызывало инактивацию на 50%, реакция с аминоктилфосфатами и хлорацетилфосфоэтанололамином была двустадийной и приводила к полной потере каталитических свойств. На рис. 1 (кривые 2, 3) в качестве примера приведены кривые падения ферментативной активности во времени при взаимодействии пирофосфатазы с метилфосфатом и фосфоэтанололамином. Рассчитанные константы скорости для первой и второй стадий реакции

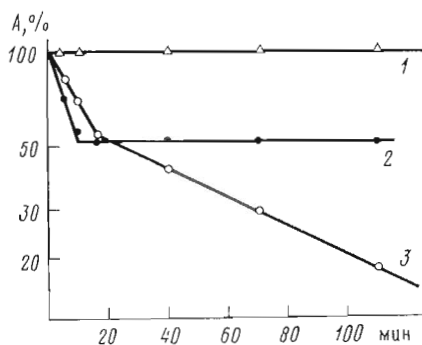


Рис. 1

Рис. 1. Взаимодействие субъединицы (1) и димера (2, 3) пирогосфатазы с О-фосфоэтанололамином (1, 3) и метилфосфатом (1, 2)

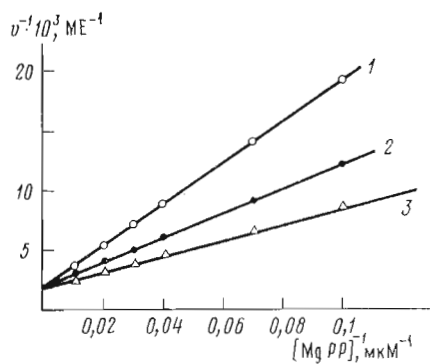


Рис. 2

Рис. 2. Гидролиз пирогосфата магния субъединицей пирогосфатазы в присутствии 4 (1), 2 мМ (2) метилфосфата и без него (3)

с фосфоэтанололамином и метилфосфатом составили соответственно $1 \cdot 10^{-3}$, $1,5 \cdot 10^{-4}$, $2,4 \cdot 10^{-3} \text{ с}^{-1}$, что хорошо совпадает с литературными данными.

Совершенно иное поведение обнаружила субъединица пирогосфатазы (рис. 1, кривая 1). Длительное выдерживание с монофосфатами не сказывалось на ее активности. Нельзя было исключить, что отсутствие реакции связано не с необходимостью димерной структуры, а с необратимыми процессами, происшедшими с мономером в условиях его получения, которые не оказывают влияния на взаимодействие с субстратом. Для ответа на этот вопрос была проведена реконструкция димера из иммобилизованной субъединицы и растворимой субъединицы, полученной диссоциацией нативного фермента, и проверена его способность к инактивации О-фосфоэтанололамином. Было установлено, что после реконструкции иммобилизованная пирогосфатаза вновь обретает способность терять активность под действием ингибитора.

Согласно предложенной ранее схеме реакции с монофосфатами, на первом этапе образуется комплекс фермент — ингибитор за счет связывания фосфатной группы реагентов в сорбционной области пирогосфатазы. Затем происходит фосфорилирование одной из субъединиц с образованием высоколабильной ацилфосфатной связи. Она гидролизуеться в условиях определения ферментативной активности и может быть обнаружена только после разрушения третичной структуры. Модификация второй субъединицы происходит более медленно, а образующаяся ацилфосфатная связь довольно устойчива [2, 3]. Отсутствие ингибирующего воздействия монофосфатов на субъединицу могло быть вызвано двумя причинами: остановкой реакции на стадии образования высоколабильной связи или невозможностью связывания реагентов в активном центре.

Для ответа на вопрос, происходит ли связывание аффинных реагентов в активном центре субъединицы, исследовано их влияние на основные кинетические параметры гидролиза пирогосфата магния: K_m и V . В качестве примера на рис. 2 приведены данные в координатах Лайнуивера — Берка для гидролиза субстрата субъединицей в присутствии метилфосфата. Видно, что метилфосфат, как и другие исследованные моноэфиры фосфорной кислоты, влияет на пирогосфатазную активность субъединицы по типу конкурентного ингибирования и, следовательно, специфически связывается ферментом. В случае мономера реакция останавливается на этой стадии обратимого связывания реагента. Действительно, субъединица, выдержанная с О- ^{3}H фосфоэтанололамином и затем подвергнутая денатурации, не содержала радиоактивной метки.

На основании полученных данных по конкурентному ингибированию рассчитаны эффективные константы Михаэлиса для мономера и димера в присутствии аффинных ингибиторов и константы ингибирования (таблица). Следует обратить внимание на значительную разницу в константах ингиби-

**Константы ингибирования (K_i , мМ) субъединицы и димера
неорганической пирофосфатазы моноэфирами фосфорной кислоты (рН 7,2; 25° С)**

Ингибитор	Субъединица	Димер	Ингибитор	Субъединица	Димер
Метилфосфат	2,5	0,37	Фосфопропаноламин	0,9	0,23
Фосфоэтанолламин	1,4	0,23	N-Хлорацетилфосфоэтанолламин	0,8	0,21

рования монофосфатами различных форм фермента, которая достигает 4–6 раз. Это свидетельствует об увеличении сродства к моноэфирам фосфорной кислоты субъединицы, находящейся в составе димера, по сравнению с индивидуальной субъединицей.

Полученные данные позволяют также сравнить константы Михаэлиса гидролиза пирофосфата магния мономером и димером пирофосфатазы. Выяснилось, что K_m субъединицы (50 мкМ) возрастает в 5 раз по сравнению с димером (10 мкМ), что указывает на ее более слабое сродство к субстрату.

Проведенное исследование позволяет сделать вывод, что образование четвертичной структуры приводит к изменениям в активном центре неорганической пирофосфатазы, вызывающим улучшение связывания как субстрата, так и аффинных ингибиторов. Выявленная разница в отношении к аффинным ингибиторам субъединицы и димерной формы фермента указывает на возможную регуляторную функцию четвертичной структуры. Она является необходимой для необратимой инактивации аффинными ингибиторами.

Экспериментальная часть

Неорганическую пирофосфатазу (КФ 3.6.11) выделяли из маточных пекарских дрожжей по видоизмененной методике Купермана [5]. Удельная активность составила 500–600 МЕ/мг.

В работе использовали морфолинэтансульфокислоту (MES), трис(оксиметил)аминометан, метилфосфат (Sigma, Англия), додецилсульфат натрия (Ferak, Зап. Берлин). O-Фосфоэтанолламин и O-фосфопропаноламин синтезировали по методике [6], N-хлорацетилфосфоэтанолламин — по методике [4].

³H-Меченный O-фосфоэтанолламин с удельной активностью 4 Ки/моль, полученный из меченого соединения, предоставлен А. В. Шишковым (Институт химической физики АН СССР), за что авторы приносят большую благодарность.

Иммобилизованную на сефарозе пирофосфатазу и субъединицу получали как в работе [1]. Концентрация белка на 1 г отжатого геля сефарозы составила 19,2 и 10,4 мкг, удельная активность 440 и 400 МЕ/мг соответственно.

Реконструкцию димерной формы пирофосфатазы из иммобилизованного мономера проводили как в работе [7].

Ферментативную активность определяли по количеству ортофосфата, образующегося из пирофосфата магния, по методам [1, 2].

Исследование влияния монофосфатов на активность иммобилизованных производных фермента. 0,1–0,5 г отжатого геля с иммобилизованным ферментом инкубировали в течение 1–2 ч в 0,1–0,5 мл 0,05 М MES-буфера, рН 6,5, содержащего 10–100 мМ моноэфир фосфорной кислоты, при 25° С. Через определенные промежутки времени отбирали аликвоты для определения пирофосфатной активности.

Реакция субъединицы с ³H-меченым O-фосфоэтанолламином. 0,1 г отжатого геля с иммобилизованной субъединицей выдерживали с 10 мМ ³H-меченым фосфоэтанолламинном в течение 1–2 ч, добавляли додецилсульфат натрия до концентрации 0,05% и инкубировали 10 мин.

Субъединицу отмывали от избытка реагентов 0,5 М NaCl, содержащим 0,05% додецилсульфат натрия, растворяли в 1 н. HCl, нейтрализовали 1 н. NaOH и просчитывали радиоактивность в сцинтилляционном счетчике «Mark II» (США).

Определение кинетических параметров гидролиза пирофосфата магния иммобилизованными производными фермента. Определяли активность фермента по начальной скорости гидролиза пирофосфата при концентрации субстрата 10–50 мкМ и фиксированной концентрации ионов магния, равной 1 мМ, в трис-HCl-буфере (рН 7,2; 25° С). Концентрации монофосфатов составляли 0,5–4,0 мМ. Полученные результаты представляли в координатах Лайнуивера — Берка. Константы ингибирования находили из графиков зависимости $K_m^{эфф}$ от концентрации ингибитора.

ЛИТЕРАТУРА

1. Плаксина Е. А., Сергиенко О. В., Склянкина В. А., Аваева С. М. Биоорганическая химия, 1981, т. 7, № 3, с. 357–364.
2. Лагутина И. О., Склянкина В. А., Аваева С. М. Биохимия, 1980, т. 45, № 9, с. 1568–1575.
3. Кузнецов А. В., Склянкина В. А., Аваева С. М. Биоорганическая химия, 1978, т. 4, № 7, с. 984–986.
4. Аваева С. М., Диков М. М., Кузнецов А. В., Склянкина В. А. Биоорганическая химия, 1977, т. 3, № 7, с. 943–949.
5. Cooperman B. S., Chin N. J., Bruckman R. H., Bunick G. J., McKenna G. P. Biochemistry, 1973, v. 12, p. 1665–1669.
6. Кузнецов А. В., Аваева С. М., Байков А. А., Склянкина В. А. Биоорганическая химия, 1977, т. 7, № 4, с. 950–956.
7. Аваева С. М., Плаксина Е. А., Склянкина В. А. Биохимия, 1979, т. 44, № 6, с. 1080–1083.

Поступила в редакцию
31.VII.1981

IMPORTANCE OF THE QUATERNARY STRUCTURE FOR AFFINITY INHIBITION OF YEAST INORGANIC PYROPHOSPHATASE

PLAKSINA E. A., SOLOPANOVA E. Yu., SVYATO I. E.,
SKLYANKINA V. A., AVAEVA S. M.

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

A comparative study has been made of the behaviour of monomeric and dimeric forms of inorganic pyrophosphatase towards affinity reagents. It has been established that both monomer and dimer are capable of binding reagents in the active centre, but only in the case of dimer the enzyme inactivation is irreversible. Substrate and inhibitors are bound by monomer 4-6 times less firmly than by dimer. The conclusion is made that the quaternary structure formation increases the affinity between the enzyme and the reagents and is necessary for irreversible affinity inhibition.